

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
28. Februar 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 02/16560 A1

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 5/08, A01N 1/02

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/09790

(22) Internationales Anmeldedatum:  
24. August 2001 (24.08.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 41 515.6 24. August 2000 (24.08.2000) DE

(71) Anmelder und

(72) Erfinder: SCHULER, Gerold [AT/DE]; Am Veilchenberg 25, 91080 Spardorf (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHULER-THURNER, Beatrice [AT/DE]; Am Veilchenberg 25, 91080 Spardorf (DE).

(74) Anwälte: HELBING, Jörg usw.; Von Kreisler Selting Werner, Postfach 10 22 41, 50462 Köln (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AU, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING READY TO USE, ANTIGEN LOADED OR UNLOADED, CRYOCONSERVED MATURE DENDRITIC CELLS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG GEBRAUCHSFERTIGER, ANTIGENBELADENER ODER -UNBELADENER, KRYOKONSERVIERTER, REIFER DENDRITISCHER ZELLEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing ready to use, antigen loaded or unloaded, cryoconserved mature dendritic cells especially for the production of a vaccine containing said dendritic cells, wherein immature dendritic cells are cultivated in the presence of suitable maturation stimuli and the mature dendritic cells thus obtained are frozen. The dendritic cells can be loaded with antigen before freezing. The invention also relates to a vaccine which can be obtained according to the inventive method and to a composition containing frozen, mature dendritic cells which are loaded with antigen.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung gebrauchsfertiger, kryokonservierter, reifer dendritischer Zellen, insbesondere zur Herstellung eines Impfstoffs, der diese dendritische Zellen enthält, wobei unreife dendritische Zellen in Gegenwart von geeigneten Reifungsstimuli kultiviert und die auf diese Weise erhaltenen reifen dendritischen Zellen eingefroren werden. Vor oder nach dem Einfrieren können die dendritischen Zellen mit Antigen beladen werden. Die Erfindung betrifft auch einen Impfstoff erhältlich durch das erfindungsgemäße Verfahren und eine Zusammensetzung enthaltend gefrorene, reife, mit Antigen beladene dendritische Zellen.

WO 02/16560 A1

## **Verfahren zur Herstellung gebrauchsfertiger, antigenbeladener oder -unbeladener, kryokonservierter, reifer dendritischer Zellen**

5 Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung gebrauchsfertiger, kryokonservierter, reifer dendritischer Zellen, insbesondere zur Herstellung eines Impfstoffs, der diese dendritische Zellen enthält, wobei unreife dendritische Zellen in Gegenwart von geeigneten Reifungsstimuli kultiviert und die auf diese  
10 Weise erhaltenen reifen dendritischen Zellen eingefroren werden. Vor oder nach dem Einfrieren können die dendritischen Zellen mit Antigen beladen werden. Die Erfindung betrifft auch einen Impfstoff erhältlich durch das erfindungsgemäße Verfahren und eine Zusammensetzung enthaltend gefrorene, reife, mit Antigen beladene dendritische Zellen.

15

### **Hintergrund der Erfindung**

Dendritische Zellen (nachfolgend kurz "DC" oder auch "DZ") sind antigenpräsentierende Zellen, die das Immunsystem durch Wechselwirkung mit Lymphozyten beeinflussen. Die meisten DC weisen immunstimulatorische Aktivität auf. Diese  
20 klassischen DC können auf verschiedene Weisen *in vivo* die Bildung von Helfer- und Killer-T-Zellen induzieren ("nature's adjuvant"). Insbesondere haben unreife DC, die in peripheren Geweben vorkommen, die Fähigkeit, Antigene zu binden und daraus immunogene MHC-Peptid-Komplexe herzustellen ("antigen processing mode"). Auf reifungsinduzierende Stimuli wie z. B. inflammatorische Cyto-  
25 kine hin entwickeln sich diese unreifen DC durch eine erhöhte Bildung von Adhäsions- und costimulatorischen Molekülen in potente T-Zell-Stimulatoren ("T-cell stimulatory mode"). Gleichzeitig wandern die Zellen in sekundäre lymphatische Organe, um seltene Antigen-spezifische T-Zellen auszuwählen und zu stimulieren. Es konnte gezeigt werden, dass DC, die aus Gewebe oder Blut isoliert wurden und *in vitro* mit Antigen beladen wurden, nach Rückinjektion als reife DC *in*  
30 *vivo* immunogen waren. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass DC CD4+ und CD8+ T-Zellimmunität sowohl in gesunden Menschen als auch in Krebspatienten induzieren können. Bei immunkompetenten, gesunden Personen konnte eine einzige Auffrischungsinjektion mit reifen DC nicht nur die Häufigkeit, sondern auch  
35 die funktionelle Avidität der CD8+ T-Zellantwort verstärken. Aus diesen Gründen

sind (insbesondere reife) DC gegenwärtig äußerst vielversprechende-Adjuvantien, um im Menschen potente T-Zellantworten gegen Tumoren und Infektionen hervorzurufen.

- 5 Eine Voraussetzung für die Verwendung von DC in der Immuntherapie ist die Entwicklung von Techniken, die es erlauben, eine große Anzahl von DC in Kultur zu produzieren, entweder aus proliferierenden CD34+-Vorläuferzellen oder nicht oder wenig proliferierenden CD14+-monozytischen Vorläuferzellen. Von Monozyten abgeleitete DC werden gegenwärtig häufig verwendet, da sie einfach ohne  
10 jede Cytokinvorbehandlung des Spenders hergestellt werden können, und da die resultierende DC-Population recht homogen und am besten charakterisiert ist. Es können z. B. aus adhärenenten Monozyten in Abwesenheit von fötalem Kälberserum (FCS) unreife DC hergestellt werden während einer in der Regel sechs- bis siebentägigen Kultur in (GM-CSF + IL-4), gefolgt von einer zumeist ein- bis  
15 dreitägigen Reifung, induziert durch autologes Monozyten-konditioniertes Medium. Eine effektive Cryokonservierung dendritischer Zellen oder ihrer Vorläuferzellen hat sich als äußerst schwierig erwiesen, außer in Gegenwart von FCS (Taylor et al. (1990) Cryobiology 27, 269; Makino et al. (1997) Scand. J. Immunol. 45, 618). Da jedoch FCS bei Vakzinierungen nicht zugegen sein darf, war es  
20 bislang immer noch notwendig, für jede DC-Vakzinierung DC neu herzustellen, entweder aus frischem Blut, aus frischen Leukaphereseprodukten oder aus gefrorenen PBMC ("peripheral blood mononuclear cells")-Aliquots aus Leukaphereseprodukten (Thurner et al. (1999) J. Immunol. Methods 223, 1). Gefrorene PBMC haben auch den Nachteil, dass nach dem Auftauen erst eine mehrtägige  
25 Kultivierung der Zellen erfolgen muß, um sie in DC zu differenzieren. Lewalle et al. (2000) J. Immunol. Methods 240, 69-78 offenbaren ein Verfahren zum Einfrieren unreifer DC, es werden aber nur schlechte Ausbeuten an überlebenden Zellen erhalten (S. 71, linke Spalte oben). Das Einfrieren von mittels GM-CSF und IL-4 aus Monozyten hergestellten unreifen dendritischen Zellen ist auch in der  
30 WO 99/46984 offenbart.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, eine Zusammensetzung wie z. B. ein Impfstoff bereitzustellen, der reife DC enthält, über einen längeren

Zeitraum ohne wesentlichen Aktivitätsverlust aufbewahrt werden kann und bei Bedarf innerhalb kurzer Zeit verabreicht werden kann.

- Die erfindungsgemäß eingesetzten DC stammen bevorzugt von demjenigen Patienten, der mit dem Impfstoff behandelt wird (autolog). Alternativ hierzu können die DC aber auch von anderen Patienten stammen (allogen), z. B. aus Leukapheresaten von normalen Freiwilligen, wie z. B. in Thurner et al. (1999) J. Immunol. Methods 283, 1-15 beschrieben.
- Überraschenderweise wurde gefunden, dass nur voll ausgereifte DC (nachfolgend auch kurz "reife DC"), die durch Kultivieren in Gegenwart eines geeigneten "Reifungscocktails" mit spezifischen Reifungsstimuli erhältlich sind, nach Einfrieren ohne FCS und Auftauen zu einem hohen Prozentsatz überleben und immunstimulierende Aktivitäten aufweisen, die vergleichbar sind mit denen von frisch präparierten, reifen DC. Beim Kultivieren mit dem Reifungscocktail werden die unreifen DC zu reifen DC differenziert. Ein besonders bevorzugter Reifungscocktail enthält Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleukin-6 (IL-6), Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und "tumor necrosis factor  $\alpha$ " TNF $\alpha$ .
- Die vorliegende Erfindung betrifft somit
- (1) ein Verfahren zur Herstellung gebrauchsfertiger, kryokonservierter, reifer dendritischer Zellen, umfassend
    - a) Bereitstellen von unreifen dendritische Zellen (DC) ;
    - b) Kultivieren der unreifen DC in einem Kulturmedium, das einen Reifungscocktail mit einem oder mehreren Reifungsstimuli enthält, unter Erhalt von reifen DC;
    - c) Einfrieren der reifen DC in einem Einfriermedium, das kein heterologes Serum enthält;
  - (2) ein Verfahren, wie vorstehend unter (1) definiert, das zur Herstellung eines Impfstoffs aus reifen, kryokonservierten DC geeignet ist;
  - (3) gefrorene, reife, mit Antigen beladene dendritische Zellen, insbesondere solche dendritische Zellen, die gemäß dem Verfahren (1) erhältlich sind;
  - (4) einen Impfstoff, umfassend dendritische Zellen, wie in (3) definiert; und

(5) Verfahren zum Auffinden vorteilhafter Bedingungen zum Einfrieren von DC, umfassend die Schritte:

- a) Bereitstellen unreifer DC;
- b) Kultivieren verschiedener Ansätze der unreifen DC in Gegenwart  
5 verschiedener Reifungsstimuli;
- c) anschließendes Kultivieren der DC in Medium mit oder ohne Cytokine, wobei ein Kultivieren ohne Cytokine bevorzugt ist;
- d) Bestimmen des Anteils lebender Zellen nach wenigstens 1 Tag Kultur in dem Medium mit oder ohne Cytokine; und
- 10 e) Ermitteln des Reifungsstimulus, der die höchste Überlebensrate ergeben hat.

In den Verfahren (1) und (2) der Erfindung werden zunächst unreife DC kultiviert, wobei ein geeigneter Reifungscocktail mit einem oder mehreren Reifungsstimuli dem Kulturmedium zugesetzt wird. Geeignete Reifungsstimuli sind dabei  
15 IL-1 wie z. B. IL-1 $\beta$  usw., IL-6, TNF- $\alpha$ , Prostaglandine wie z. B. PGE<sub>2</sub> usw., IFN- $\alpha$ , Lipopolysacchariden und andere bakterielle Zellprodukte wie z. B. MPL (Monophosphoryllipid A), Lipoteichonsäure usw., Phosphorylcholin, Calciumionophore, Phorbolster wie PMA, Heat-Schock-Proteine, Nukleotide wie z. B. ATP usw., Li-  
20 popeptide, künstliche Liganden für Toll-ähnliche Rezeptoren, doppelsträngige RNA wie z. B. Poly-I:C usw., immunstimulatorische DNA-Sequenzen, CD40-Ligand usw.. Besonders bevorzugt im Sinne der Erfindung ist, wenn das Kulturmedium oder der Reifungscocktail IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE<sub>2</sub> und TNF $\alpha$  enthält oder der Reifungscocktail Monocyten-konditioniertes Medium (MCM) oder MCM mit zusätz-  
25 lichem PGE<sub>2</sub> ist. In einer bevorzugten Ausführungsform der Verfahren (1) und (2) können die DC während oder nach dem Kultivierungsschritt mit Antigen beladen werden. Nach Reifung und gegebenenfalls Beladung mit Antigen werden die DC in Einfriermedium eingefroren, das kein heterologes Serum wie z. B. FCS enthält. Heterologes Serum im Sinne dieser Anmeldung ist Serum, das nicht von der Spe-  
30 zies Mensch stammt. Erfindungsgemäß ist es aber möglich, sowohl autologes Serum oder Plasma (das von dem gleichen Menschen stammt wie die DC) als auch allogen Serum oder Plasma (das von einem anderen Menschen stammt als die DC) zu verwenden.

Unreife DC im Sinne dieser Anmeldung sind CD83 (und/oder p55/fascin- und/oder DC-LAMP-) negative (oder nur schwach und/oder zu geringem Prozentsatz positive), im Vergleich zu reifen DC nur geringe Mengen an Klasse-I- und Klasse-II-MHC sowie Adhäsions- bzw. kostimulatorischen Molekülen (z. B. insbesondere CD86, CD80, CD40) exprimierende Leukozyten, welche nach einem geeigneten Reifungsstimulus in reife DC differenzieren.

Reife DC im Sinne dieser Anmeldung sind Leukozyten, welche sich nach Einwirkung eines Reifungsstimulus aus unreifen DC entwickeln, eine verstärkte Expression von CD83 (und/oder p55/fascin und/oder DC-LAMP) sowie von Klasse-II- und Klasse-I-MHC-Molekülen und Adhäsions- bzw. kostimulatorischen Molekülen zeigen, insbesondere von CD86, CD80, CD40. Weiter zeigen die reifen DC eine deutlich erhöhte T-Zell-stimulatorische Kapazität im Vergleich zu unreifen DC (z. B. zeigen sie im Gegensatz zu unreifen DC eine eindeutige stimulatorische Aktivität in der allogenen MLR noch bei einem DC:T-Verhältnis um  $\leq 1:100$ ); zudem ist ein Charakteristikum der reifen DC im Sinne dieser Anmeldung, dass diese DC stabil sind, d. h. ihre Eigenschaften eines reifen Phänotyps und einer starken T-Zell-stimulatorischen Kapazität auch behalten, wenn sie in Abwesenheit von Zytokinen für 1-2 Tage oder länger kultiviert werden. Im Gegensatz dazu sind DC, die nicht voll ausgereift sind, nicht stabil und differenzieren zu unreifen DC oder z. B. zu adhärenenten Makrophagen.

Die unreifen DC können aus verschiedenen bekannten Quellen bereitgestellt werden. Die Vorläuferzellen der unreifen DC sind in der Regel nicht-proliferierende CD14-positive mononukleäre Zellen (PBMC; Monozyten) oder proliferierende CD34-positive Zellen. Beispielsweise können aus Leukaphereseprodukten PBMC isoliert werden. Die PBMC können wie beschrieben zu unreifen DC differenziert werden (Thurner et al. (1999) J. Exp. Med. 190, 1669). Dazu werden die PBMC in Gegenwart von IL-4 (oder IL-13; Romani et al. (1996) J. Immunol. Methods 196, 137-151) und GM-CSF ("granulocyte-macrophage-colony stimulating factor") kultiviert. Aus CD14-positiven Monocyten können unreife DC auch durch Kultivierung in Gegenwart von GM-CSF und IFN $\alpha$  hergestellt werden (Santini et al. (2000) J. Exp. Med. 191, 1777-1788). Aus CD34-positiven Zellen können durch Kultivierung in Gegenwart von GM-CSF, SCF ("stem cell factor") und TNF $\alpha$  un-

reife DC erhalten werden. Die unreifen dendritischen Zellen können auch direkt aus frischem Blut gewonnen werden wie z. B. in Nestle et al. (1998) Nat. Med. 4, 328 beschrieben. Im Blut existieren auch präformierte CD11c+ und CD11c- DC (O'Doherty et al. (1994) Immunology 82, 487-493) sowie M-DC8-DC (Schakel et al. (1999) Pathobiology 67, 287-290). Auch diese DC können aus dem Blut isoliert werden und weiter in dem erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden.

Die bevorzugten Konzentrationen der verschiedenen Reifungsstimuli im Kulturmedium liegt im Bereich von 0,1 ng/ml bis 100 µg/ml, vorzugsweise 1 ng/ml bis 10 µg/ml. Für den besonders bevorzugten Reifungscocktail der vorliegenden Erfindung beträgt die Konzentration der Reifungsstimuli 0,1 bis 100 ng/ml IL-1β, 0,1 bis 100 ng/ml IL-6, 0,1 bis 10 µg/ml PGE<sub>2</sub> und 0,1 bis 100 ng/ml TNFα (am bevorzugtesten ist die Konzentration dieser speziellen Reifungsstimuli ungefähr 10 ng/ml IL-1β, 10 ng/ml IL-6, 1 µg/ml PGE<sub>2</sub> und 10 ng/ml TNFα). Die Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentrationen der Stoffe im Zellkulturmedium, in dem die DC kultiviert werden. Eine Möglichkeit, die DC in Gegenwart der genannten Wirkstoffe auszureifen, besteht darin, die unreifen DC in Gegenwart von Monocyten-konditioniertem Medium (MCM) zu kultivieren. MCM enthält IL-1β, IL-6, PGE<sub>2</sub> und TNFα. Es kann durch Kultivierung von PBMC in Medium ohne Cytokine gewonnen werden, wie zum Beispiel in Romani et al. (1996) J. Immunol. Methods 196, 137 beschrieben. Bei der Ausreifung der DC durch MCM enthält das Kulturmedium 1-100 %, vorzugsweise 5-25 % MCM. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung erfolgt die Ausreifung der DC durch Zusatz von MCM und einer definierten Menge PGE<sub>2</sub>. Es wurde nämlich gefunden, dass Schwankungen in der Fähigkeit von MCM, DC bestmöglich auszureifen, durch Zusatz von PGE<sub>2</sub> (bevorzugt in den oben angegebenen Konzentrationen) aufgefangen werden können. Erfindungsgemäß ist es aber bevorzugt, die DC durch Zusatz definierter optimaler Mengen der Wirkstoffe IL-1β, IL-6, PGE<sub>2</sub> und TNFα auszureifen. Das bedeutet, dass die Reifungszusammensetzung aus gereinigten Zubereitungen der einzelnen Wirkstoffe hergestellt wird. Dadurch werden bessere Ergebnisse erzielt als bei der Ausreifung mit MCM oder MCM+PGE<sub>2</sub>. IL-1β, IL-6, PGE<sub>2</sub> und TNFα sind in GMP ("good manufacturing practice")-Qualität erhältlich. Üblicherweise erfolgt die Reifung durch Kultivierung in Gegenwart der genannten Stoffe für wenigstens 1 Stunde, vorzugsweise 2 Stunden und besonders bevor-

zugt wenigstens 6 Stunden. Besonders bevorzugt im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Reifezeiten von 6 bis 96 Stunden, vorzugsweise von 18 bis 36 Stunden (im Falle der Verwendung von Leukopharesen als Ausgangsmaterial) bzw. für 36 bis 60 Stunden (bei Verwendung von Frischblut oder buffy als Ausgangsmaterial).

Erfindungsgemäß werden die DC während und/oder nach dem genannten Reifungsschritt mit wenigstens einem Antigen oder einem Antigen-Antikörperkomplex beladen. Erfindungsgemäß kann die Antigen-Beladung vor oder nach dem Einfrieren erfolgen. Erfolgt sie nach dem Einfrieren, dann werden die DC erst nach dem Wiederauftauen mit Antigen beladen. Bevorzugt ist aber eine Beladung mit Antigen vor dem Einfrieren der DC. Das hat den Vorteil, dass die DC unmittelbar nach dem Auftauen einsatzbereit sind.

Antigene im Sinne dieser Anmeldung sind Proteine, Proteinfragmente, Peptide sowie davon abgeleitete Moleküle (z. B. glykosierte Verbindungen oder Verbindungen mit sonstigen chemischen Modifikationen), aber auch die dafür kodierende Nukleinsäure, Viren, ganze pro- bzw. eukaryontische Zellen oder Fragmente davon oder apoptotische Zellen. Unter "Beladung durch Antigen" wird ein Prozess verstanden, der dazu führt, dass MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche der DC Peptide "präsentieren", also einen Komplex mit den MHC-Molekülen aufweisen. Während durch spezifische Peptide eine direkte Beladung der MHC-Moleküle möglich ist, müssen Protein(fragment)e erst prozessiert werden, also zunächst von der Zelle aufgenommen werden. Nach intrazellulärer Spaltung der Proteine und Beladung von MHC mit Peptid werden MHCII-Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche präsentiert. Als Antigene kommen zunächst vor allem Proteine oder Proteinfragmente in Frage. Die Proteine können nativen Ursprungs sein oder rekombinant hergestellt worden sein. Durch die Reifung und Beladung mit Protein-Antigen entstehen auf der Zelloberfläche der DC MHCII-Peptid-Komplexe, die Peptidfragmente des zugesetzten Antigens umfassen. Die Konzentration des Protein-Antigens im Kulturmedium ist in der Regel 0,1 bis 100 µg/ml, vorzugsweise 1 bis 50 µg/ml, am bevorzugtesten 1 bis 10 µg/ml.



Wird als Antigen ein Protein (d. h. ein Polypeptid mit mehr als 50 Aminosäureresten) eingesetzt, so sollte die Beladung vorzugsweise während der Reifung der DC erfolgen. Dann erfolgt eine besonders effektive Präsentation der Antigenfragmente durch MHCII-Moleküle. Das Protein(fragment) muß nicht während des gesamten Reifungszeitraums anwesend sein, es sollte aber wenigstens für einen Teil des Reifungszeitraums sowohl die Reifungszusammensetzung als auch das Protein(fragment) gleichzeitig anwesend sein. Beispiele für Proteinantigene sind KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) als weit verwendetes positives Kontrollantigen, MAGE-3-Protein als Beispiel für ein Tumorantigen, sowie Hepatitis B Oberflächenantigen (HbsAg) oder HIV-1 gp 160-Protein als Beispiel für ein zur Behandlung von viralen Erkrankungen sinnvolles Protein.

Bei einer Beladung mit "kurzen Polypeptiden" oder Proteinfragmenten (z. B. kurze Polypeptide mit bis zu 50 Aminosäureresten, die exakt in die MHC-Moleküle an der DC-Oberfläche hineinpasse) sind neben der obengenannten Beladung während der Reifung auch eine Beladung nach der Reifung, nämlich vor dem Einfrieren oder nach dem Wiederauftauen, möglich. Bei solch einer Beladung nach der Reifung werden die kurzen Polypeptide zu gewaschenen DC zugegeben.

Eine weitere Möglichkeit der Beladung mit Antigen stellt die Zugabe von apoptotischen oder lysierten Zellen zum Kulturmedium dar. Die zugesetzten Zellen können dann von den DC phagocytiert werden. Diese Methode hat den Vorteil, dass neben MHC-Klasse-II-Molekülen auch Klasse-I-Moleküle effektiv beladen werden. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass selbst bei Gabe von Proteinen (insbesondere partikulärer Natur) Präsentation auch auf MHC -Klasse-I-Molekülen stattfindet. Beispielsweise kann man, anstatt die DC in Gegenwart von Mage-3 Tumorprotein oder -peptid zu kultivieren, den DC Zellfragmente (von nekrotischen Zellen oder apoptotischen Tumorzellen) zusetzen, die Mage-3 enthalten.

Es können DC auch dadurch mit Antigen beladen werden, dass DC z. B. mit Tumorzellen fusioniert werden. Eine solche Fusion kann mittels Polyethylenglycol oder Elektroporation erreicht werden.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung werden die DC dadurch mit Antigen beladen, dass sie transfiziert oder viral infiziert werden. Dadurch werden Nukleinsäuren, die für Antigene kodieren, in die DC eingebracht und zur Expression gebracht. Beispielsweise kann eine DNA- oder RNA-Transfektion oder eine Infektion mit Adenoviren in geeigneter Weise durchgeführt werden. Dadurch ist auch eine Beladung der MHC-Klasse-I-Moleküle möglich. Beispielsweise kann auch aus Tumorzellen präparierte RNA transfiziert werden. Zur Transfektion können gängige Methoden wie z. B. Elektroporation eingesetzt werden.

- 10 Wie vorstehend ausgeführt, kann während des Reifungszeitraums oder nach dem Reifungszeitraum spezifisches Antigen-Peptid (d. h. "kurze Polypeptide") zugesetzt werden, um MHC-Moleküle der Klasse I oder II direkt zu beladen. Das Peptid-Antigen kann vor der Reifungszusammensetzung zu den Zellen gegeben werden, es wird aber vorzugsweise gleichzeitig oder danach zugesetzt. Die Antigenbeladung erfolgt vorzugsweise für wenigstens 10 min, mehr bevorzugt für 1 bis 24 Stunden, am bevorzugtesten für 3 bis 12 Stunden.

- Die Peptide (d. h. "kurze Polypeptide") haben in der Regel wenigstens 8 Aminosäuren. Vorzugsweise haben solche Peptide 8 bis 12 Aminosäuren (MHCI) bzw. 8 bis 25 Aminosäuren (MHCII). Die Konzentration des Peptids im Kulturmedium zur Beladung beträgt in der Regel 0,01 bis 1000  $\mu\text{M}$ , vorzugsweise 0,1 bis 100  $\mu\text{M}$ , am bevorzugtesten 1 bis 20  $\mu\text{M}$ .

- Als einsetzbare Peptide sind alle Peptide denkbar, die von MHC-Molekülen präsentiert werden können. Bevorzugt sind Peptide, die von Proteinen abgeleitet sind, die von Krankheitserregern stammen. Dabei kann es sich auch um Peptide handeln, die Variationen der natürlich vorkommenden Aminosäuresequenz aufweisen. Solche Variationen sind in der Regel ein oder zwei Aminosäureaustausche. Beispiele für Peptidantigene sind das Influenza-Matrix-Peptid (IMP) mit der Aminosäuresequenz GILGFVFTL (SEQ ID NO:1) oder das Melan A-analoge Peptid mit der Sequenz ELAGIGILTV (SEQ ID NO:2). Beispiele für weitere mögliche Peptide sind in Fig. 26 dargestellt.

Neben "Peptid-/Proteinpulsing" kann auch "Peptid-/Protein-transloading" durchgeführt werden, um DC mit Antigen zu beladen.

Wie vorstehend angeführt, können die DC auch mit Antigen-Antikörperkomplexen  
5 beladen werden. Geeignete Antigene hierfür sind alle vorstehend erwähnten Antigene. Antigen-Antikörperkomplexe im Sinne der vorliegenden Erfindung sind Komplexe dieser Antigene mit geeigneten Antikörpern, z. B. Antigen-IgG- oder IgE-Komplexe. Das Beladen von DC mit solchen Antigenen ist in Reynault, A. et al., J. Exp. Med. 189(2):371-80 (1999) beschrieben, worauf hier ausdrücklich  
10 Bezug genommen wird.

Nach Reifung und gegebenenfalls Antigenbeladung der DC können die reifen DC in Einfriermedium eingefroren werden. Das Einfriermedium kann neben der Serumkomponenten noch ein oder mehrere Gefrierschutzmittel (z. B. von 0,1 bis 35  
15 % (v/v), vorzugsweise 5 bis 25 % (v/v)) enthalten. Geeignete Gefrierschutzmittel sind dabei vorzugsweise die folgenden Verbindungen: DMSO, Glycerin, Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenglykol, Albumin, Cholinchlorid, Aminosäuren, Methanol, Acetamid, Glycerinmonoacetat, anorganische Salze usw. Das bevorzugte Gefrierschutzmittel ist DMSO, das vorzugsweise in einer Konzentration von 5 bis 25 %  
20 (v/v), bevorzugter 10 bis 20 % (v/v), am bevorzugtesten ungefähr 10 % DMSO, im Einfriermedium enthalten ist. Das Einfriermedium kann eine nicht heterologe Serumkomponente enthalten, vorzugsweise in einer Konzentration von 2 bis 90 % (w/v), bevorzugt 5 bis 80 % (w/v), wobei humanes Serumalbumin, vorzugsweise in einer Konzentration von 10 bis 30 % (w/v) besonders bevorzugt ist. Be-  
25 vorzugter ist es jedoch, dass das Einfriermedium anstelle von humanem Serumalbumin autologes Serum oder Plasma enthält. Es kann auch humanes, allogenes Serum oder Poolserum enthalten sein. Ebenfalls kann als Zusatz in dem Einfriermedium eine oder mehrere von Kohlenhydraten abgeleitete Polyolverbindungen, insbesondere ausgewählt aus Glukose, Dextran, Sucrose, Ethylenglykol, Erythrit,  
30 D-Ribit, D-Mannit, D-Sorbit, Inosit, D-Laktose usw. enthalten sein, vorzugsweise in einer Konzentration von 2 bis 30 %, mehr bevorzugt 5 bis 10 %, am bevorzugtesten etwa 5 % (w/v). Das bevorzugteste Einfriermedium ist reines autologes Serum mit ungefähr 10 % DMSO und ungefähr 5 % Glukose. In der Regel

werden die Zellen vor dem Einfrieren abzentrifugiert, um sie zu konzentrieren und im Einfriermedium aufzunehmen.

Die bevorzugte Konzentration von Zellen im Einfriermedium ist 1 bis  $100 \times 10^6$  Zellen/ml, die bevorzugteste Konzentration ist ungefähr  $5 \times 10^6$  Zellen/ml bis  $20 \times 10^6$  Zellen/ml.

Es wurde ebenfalls gefunden, dass die Überlebensrate von DC erhöht wird, wenn die DC vor dem Einfrieren oder nach dem Auftauen mit einem anti-apoptotischen Molekül in Kontakt gebracht werden. In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens werden daher vor dem Einfrieren oder nach dem Auftauen die DC mit einem Molekül in Kontakt gebracht, das die Apoptose hemmen kann. Bevorzugte anti-apoptotische Moleküle sind CD40 Ligand (CD40L)(Morris et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 418), TRANCE (Wong et al. (1997) J. Exp. Med. 186, 2075) oder RANKL (Anderson et al. (1997) Nature 390, 175). Vorzugsweise wird wenigstens eines der Moleküle vor dem Einfrieren oder nach dem Auftauen der DC wenigstens 10 min, bevorzugt wenigstens 1 Stunde, bevorzugter wenigstens 4 Stunden dem Kulturmedium zugesetzt. Bevorzugte Konzentrationen im Kulturmedium sind 1 ng/ml bis 5 µg/ml (RANKL/TRANCE) bzw. 1 ng/ml bis 1 µg/ml (CD40L). Besonders bevorzugte Konzentrationen sind 0,5 bis 1 µg/ml (RANKL/TRANCE) und 0,1 bis 0,5 µg/ml (CD40L).

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens werden die DC weiterhin in Gegenwart des immunosuppressiven Interleukin-10 (IL-10) oder anderer Immun-/Reifungsmodulatoren wie z. B. Vitamin D3 und dessen Derivate, Fumarsäure und Derivate davon wie z. B. Ester usw., Mycophenolatmofetil usw. kultiviert. Derartig behandelte Zellen werden nicht zur Stimulation des Immunsystems eingesetzt, vielmehr soll eine Toleranz gegen bestimmte Antigene induziert werden. Die Konzentration dieser Modulatoren und von IL-10 im Medium beträgt 1 - 1000 ng/ml, bevorzugt 10 - 100 ng/ml.

Gemäß Ausführungsform (4) betrifft die vorliegende Erfindung auch einen Impfstoff, der durch das erfindungsgemäße Verfahren erhältlich ist. Der erfindungsgemäße Impfstoff kann neben den reifen, Antigen-beladenen DC weiterhin phar-

pharmazeutisch verträgliche Hilfsstoffe enthalten. Nach dem Auftauen des erfindungsgemäßen Impfstoffs können noch verschiedene Stoffe zugesetzt werden, die pharmazeutisch verträglich und für eine Verabreichung vorteilhaft sind.

- 5 Gemäß Ausführungsform (3) betrifft die Erfindung auch gefrorene, reife, mit Antigen beladene dendritische Zellen. Diese erfindungsgemäßen Zellen können Bestandteil einer pharmazeutischen Zusammensetzung sein, die neben den Zellen noch übliche, für die Verabreichung an Menschen geeignete Zusatzstoffe enthält.
- 10 Die vorliegende Erfindung stellt zum ersten Mal einen Impfstoff zur Verfügung, der reife, Antigen-beladene DC enthält und eingefroren werden kann. Ein wesentlicher Vorteil der Erfindung ist es, dass die Überlebensrate der DC nach dem Auftauen sehr hoch ist. Nach dem Auftauen der eingefrorenen DC erhält man in der Regel mehr als 75 %, bevorzugt mehr als 85 % überlebende DC, bezogen
- 15 auf die Anzahl eingefrorener DC. Derartig hohe Überlebensraten von aufgetauten DC waren bislang ohne Zusatz von FCS nicht erreicht worden. Dies ist aber eine wichtige Voraussetzung, um eine wirksame Immunstimulation zu erzielen. Ein erheblicher Vorteil des Einfrierens von reifen, Antigen-beladenen DC ist, dass zahlreiche Aliquots eines Impfstoffs hergestellt und eingefroren werden können.
- 20 Dadurch ist der Impfstoff bei Bedarf sofort verfügbar und kann ohne langwierige Kultur-Schritte innerhalb kürzester Zeit appliziert werden. Durch eine Antigenbeladung erst nach Einfrieren und Wiederauftauen reifer DC ist es möglich, die DC nach den jeweiligen Gegebenheiten variabel zu beladen. Beispielsweise kann bei einer sich entwickelnden Überstimulation bzw. Allergie gegenüber einem der zur
- 25 Vakzination eingesetzten Peptide auf dieses bei der Beladung verzichtet werden.

- Es wurde überraschenderweise gefunden, dass es zum Auffinden geeigneter Verfahren zum Einfrieren von DC nicht ausreichend ist, die unmittelbaren Einfrierparameter wie z. B. Einfriermedium und Abkühlgeschwindigkeit zu variieren
- 30 und die Überlebensrate unmittelbar nach dem Auftauen zu bestimmen. Diese unmittelbare Überlebensrate entspricht nicht unbedingt einem Überleben frisch hergestellter DC während mehrtägiger Kultur in der Abwesenheit von Cytokinen.

Vielmehr spielt auch die Reifung bzw. der verwendete Reifungsstimulus vor dem Einfrieren eine entscheidende Rolle für das Überleben der Zellen. Der Erfindung liegt somit auch die Erkenntnis zugrunde, dass der erfindungsgemäße Reifungsstimulus nicht nur zu einer vollen DC-Reifung führt, sondern auch DC liefert, die besser überleben können als DC, die durch andere Stimuli gereift worden sind. Bisher wurde dem Reifungsstimulus im Hinblick auf das Einfrieren überhaupt keine Beachtung geschenkt.

Es wurde auch gefunden, dass es eine hervorragende Methode zur Optimierung des Verfahrens zum Einfrieren von DC ist, DC mittels verschiedener Reifungsstimuli auszureifen und dann als "Read Out" das Überleben nach Kultur in Kompletmedium ohne jeglichen Cytokinzusatz zu testen. Der Reifungsstimulus, der am höchsten viable DC induziert, wird zur Herstellung von DC verwendet, die dann eingefroren werden.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung ist daher ein Verfahren zum Auffinden vorteilhafter Bedingungen zum Einfrieren von DC, wobei unreife DC bereitgestellt werden und in Gegenwart verschiedener Reifungsstimuli kultiviert werden, die Zellen anschließend in Medium mit oder ohne Cytokine, vorzugsweise ohne Cytokine, kultiviert werden, nach wenigstens einem Tag Kultur in Medium mit oder ohne Cytokine der Anteil überlebender Zellen bestimmt wird und schließlich der Reifungsstimulus ermittelt wird, der die höchste Überlebensrate an DC ergeben hat. Dieser Reifungsstimulus wird dann zur Herstellung von DC verwendet, die eingefroren werden. Vorzugsweise wird die Anzahl lebender Zellen erst nach wenigstens 2 Tagen Kultur in Medium ohne Cytokine bestimmt, am bevorzugtesten nach wenigstens 3 Tagen.

### Figurenbeschreibung

Figur 1 zeigt den Einfluß der Zellkonzentration in den Einfriergefäßen auf die Ausbeute an DC nach dem Auftauen. Reife DC wurden aus Leukaphereseprodukten gesunder Erwachsener hergestellt, wobei zunächst adhärente Monozyten durch sechstägige Kultur in GM-CSF + IL-4 in unreife DC umgewandelt wurden, dann eine Reifung für einen Tag durch einen Vierkomponenten-Cocktail beste-

hend aus  $\text{TNF}\alpha$  + IL-1 $\beta$  + IL-6 +  $\text{PGE}_2$  erfolgte (s. Beispiel 1). Reife (Tag 7) DC wurden mit einer Einfriergeschwindigkeit von  $-1^\circ\text{C}/\text{min}$  in reinem autologen Serum + 10 % DMSO + 5 % Glukose bei verschiedenen Zelldichten (DC-Zahl/ml) eingefroren. Nach dem Auftauen der reifen DC wurden die Ausbeuten lebender DC (angegeben als Anteil an der Anzahl eingefrorener DC in Prozent) unmittelbar (= d7) und nach mehreren Tagen in Kultur (nach 1 Tag = d8, nach 2 Tagen = d9, etc.) bestimmt. Die letztgenannte Bestimmung wurde in Kompletmedium, aber ohne Zusatz von GM-CSF oder IL-4, durchgeführt, da dieser harte "washout test" eine etablierte Methode ist, um zu bestimmen, ob DC tatsächlich voll ausgereift und stabil sind. Einfrieren bei  $10 \times 10^6$  reifen DC/ml lieferte die besten Ergebnisse ( $p < 0,05$  an Tag 7,  $p < 0,01$  an allen anderen Tagen;  $n = 3$ ).

Figur 2 zeigt den Einfluß verschiedener Einfriermedien auf die DC-Ausbeute nach dem Wiederauftauen. DC wurden hergestellt wie in der Legende zu Figur 1 beschrieben, und Aliquots wurden in einer Konzentration von  $10 \times 10^6$  DC/ml in HSA + 10 % DMSO, in autologem Serum + 10 % DMSO sowie in autologem Serum + 10 % DMSO + 5 % Glukose (Endkonzentrationen) eingefroren. Die DC-Ausbeuten nach Einfrieren und Wiederauftauen wurden bestimmt wie für Figur 1 beschrieben. Einfrieren in autologem Serum + 10 % DMSO + 5 % Glukose ergab die besten Resultate ( $p < 0,05$  an Tag 8;  $n = 4$ ).

Figur 3 zeigt die Überlebensrate frischer DC im Vergleich mit der eingefrorener und wiederaufgetauter DC in "Washout tests". Reife, d7-DC wurden wie zu Figur 1 beschrieben hergestellt, und frisch hergestellte sowie eingefrorene ( $-1^\circ\text{C}/\text{min}$  in reinem autologen Serum + 10 % DMSO + 5 % Glukose bei einer Zelldichte von  $10 \times 10^6$  DC/ml) und wiederaufgetaute (nach mehr als 3 Stunden Lagerung in der Gasphase von flüssigem Stickstoff) DC wurden dann für mehrere Tage in Medium ohne Cytokine ("washout test") wie in Figur 1 beschrieben kultiviert. Die Ausbeuten an lebenden DC sind als Prozentangaben der Gesamtzahl an DC, die in die Wells an Tag 7 ausgesät wurden, angegeben. Es gab keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen frisch hergestellten und gefrorenen/aufgetauten DC ( $n = 4$ ).

Figur 4 zeigt, dass Einfrieren und Wiederauftauen die charakteristische Morphologie reifer DC nicht verändert. Reife, d7-DC, die wie zu Figur 1 beschrieben hergestellt worden waren, wurden für weitere 2 Tage entweder unmittelbar weiterkultiviert oder nach Einfrieren, mindestens 3 Stunden Lagerung in der Gasphase von flüssigem Stickstoff und Wiederauftauen weiterkultiviert. Sogar nach 48 Stunden weiterer Kultur in der Abwesenheit von Cytokinen ("washout test") blieben die nicht eingefrorenen (links) und die eingefrorenen/wiederaufgetauten DC (rechts) stabile, nicht adhärierende Zellen.

Figur 5 zeigt, dass Einfrieren und Wiederauftauen den charakteristischen Phänotyp reifer DC nicht verändert. Reife, d7-DC, die wie zu Figur 1 beschrieben frisch hergestellt worden waren, wurden durch FACS-Analyse phänotypisiert (frische DC, Tag 7). Aliquots wurden eingefroren, mindestens 3 Stunden in der Gasphase von flüssigem Stickstoff gelagert, wiederaufgetaut, anschließend wurde ihr Phänotyp unmittelbar (DC eingefroren/aufgetaut d7) oder nach weiteren 3 Tagen in Kultur (DC eingefroren/aufgetaut d10) in der Abwesenheit von Cytokinen ("washout test") bestimmt. Eingefrorene/wiederaufgetaute, reife, d7-DC haben den charakteristischen Phänotyp reifer DC (CD14-, CD83 homogen++), sogar nach Entfernen von Cytokinen und weiterer Kultur für 3 Tage behalten.

Figur 6 zeigt, dass Einfrieren und Wiederauftauen die stimulatorische Kapazität reifer DC in der primären allogenen MLR ("Mixed Leukocyte Reaction") nicht verändert. Reife d7-DC wurden wie zu Figur 1 dargestellt hergestellt und die allostimulatorische Potenz frisch hergestellter, nicht eingefrorener DC wurde mit einem Aliquot dieser DC, das eingefroren und wiederaufgetaut worden war (nach 3-stündiger Lagerung in flüssigem Stickstoff), verglichen.

Figur 7 zeigt, dass Einfrieren und Auftauen die Fähigkeit reifer DC, eine starke IMP-spezifische CTL-Antwort zu induzieren, nicht verändert. Frisch hergestellte oder eingefrorene/wiederaufgetaute HLA-A2.1 + reife d7-DC wurden mit Influenza-Matrixpeptid (= IMP) GILGFVFTL (SEQ ID NO:1) beladen oder unbehandelt gelassen und mit autologen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (T:DC-Verhältnis = 10:1) ohne Zugabe jeglicher Cytokine kultiviert. Zusätzlich wurden gereinigte CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ohne DC ± Zugabe von IMP kultiviert. Nach 7 Tagen wurden die T-Zellen geerntet



und auf ihre zytolytische Aktivität hin untersucht, wozu ein Standard-<sup>51</sup>Cr-Freisetzungssassay verwendet wurde. T2-Zellen, die ohne oder mit 10 µg/ml IMP gepulst waren, dienten als Zielzellen.

5 Figur 8 zeigt, dass Einfrieren und Auftauen die Fähigkeit reifer DC, eine starke IMP-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort zu induzieren, nicht verändert (HLA-A2.1/Peptidtetrameranalyse). Frisch hergestellte oder eingefrorene/wiederaufgetaute HLA-A2.1 + reife d7-DC wurden mit IMP beladen (im Fall von gefrorenen/wiederaufgetauten Zellen vor dem Einfrieren oder nach dem  
10 Auftauen) oder unbehandelt gelassen und für 7 Tage mit autologen, nicht-adhärenzierenden Fraktionen von PBMC (PBMC:DC-Verhältnis = 30:1) ohne Zugabe jeglicher Cytokine co-kultiviert, geerntet und mit HLA-A2.1/IMP-Tetrameren (X-Achse) und anti-CD8 (Y-Achse) doppelgefärbt. Die Expansion IMP-Peptid-spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (der Prozentsatz Tetramer-bindender CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ist in  
15 der Figur angegeben) ist vergleichbar für frische und eingefrorene DC. Beladung von DC vor dem Einfrieren und nach dem Auftauen zeigt keinen Unterschied.

Figur 9 zeigt, dass Kontakt mit CD40L die Überlebensrate aufgetauter DC weiter verbessert. Reife d7-DC wurden hergestellt wie zu Figur 1 beschrieben. Nach  
20 dem Auftauen wurde lösliches, primäres CD40L (100 ng/ml) für 4 Stunden zugesetzt, dann wurden die DC gewaschen und für mehrere Tage in Medium ohne Cytokine ("washout test") kultiviert wie in der Legende zu Figur 3 beschrieben. Die Ausbeuten lebender DC (angegeben als Prozentsatz eingefrorener DC) wurden unmittelbar (= d7) sowie nach mehreren Tagen in Kultur (nach 1 Tag = d8,  
25 nach 2 Tagen = d9, etc.) bestimmt. CD40L-Behandlung von DC ergab eine verbesserte Überlebensrate, insbesondere über Tag 2 der weiteren Kultur hinaus (p < 0,01 an Tag 10 und Tag 11; n = 5).

Figur 10 zeigt, dass DC erfolgreich mit Protein-Antigen vor dem Einfrieren beladen werden können. DC wurden in ihrem unreifen Stadium durch Zugabe des Modellantigens Tetanustoxoid (TT) (10 µg/ml) an Tag 6 gepulst. Reife DC wurden  
30 dann an Tag 7 geerntet und eingefroren wie in der Legende zu Figur 3 beschrieben. Eingefrorene, TT-gepulste DC waren ebenso stimulatorisch wie frisch hergestellte TT-gepulste, reife DC.

Figur 11 zeigt, dass DC erfolgreich mit Peptid-Antigen vor Einfrieren beladen werden können. Eingefrorene/aufgetaute (siehe Figur 3) HLA-A2.1 + reife d7-DC wurden mit Melan-A-analogem Peptid ELAGIGILTV (SEQ ID NO:2) entweder vor dem Einfrieren oder nach dem Auftauen beladen oder unbehandelt gelassen und für 7 Tage mit autologen, nicht-adhärierenden Fraktionen von PBMC (PBMC:DC-Verhältnis = 20:1) ohne Zugabe jeglicher Cytokine co-kultiviert, geerntet und mit HLA-A2.1/Melan-A-Tetrameren (X-Achse) und anti-CD8 (Y-Achse) doppelgefärbt. Die Expansion Melan-A-Peptid-spezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (der Prozentanteil Tetramer-bindender CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ist in der Figur angegeben) ist vergleichbar für eingefrorene DC, die vor dem Einfrieren oder nach dem Auftauen beladen worden sind. Siehe dazu auch Figur 8.

Figur 12 zeigt die Induktion einer Helferzell Typ 1-Antwort gegen KLH in Patienten, die wie in Beispiel 6 beschrieben vakziniert wurden.

Figuren 13-15 zeigen die Ergebnisse von Beispiel 7.

Figur 16 zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus von Beispiel 8. Die Ergebnisse des Beispiels 8 sind in Figuren 17 und 18 zusammengefasst.

Figur 17A zeigt die Gesamtzahl der DC nach Beladung mit Tumor-Zell-Lysat oder nekrotischen Tumorzellen *und* nachfolgender Kryokonservierung.

Figur 17B zeigt die Allostimulatorische Potenz von DC nach Beladung mit Tumor-Zell-Lysat oder nekrotischen Tumorzellen und nachfolgender Kryokonservierung.

Figur 17C zeigt das Resultat der FACS Analyse nach Tumorbeladung und Kryokonservierung.

Figur 18A zeigt das Ergebnis der Bestimmung der Gesamtzahl der DC nach Beladung mit apoptotischen Tumorzellen *und* nachfolgender Kryokonservierung.

Figur 18B zeigt die Allostimulatorische Potenz von DC nach Beladung mit apoptotischen MEL 526 Melanomzellen und nachfolgender Kryokonservierung.

5 Figur 18C zeigt die Ergebnisse der FACS Analyse der MAGE-1/HLA-A1 Ag-Expression auf Mage-1 Peptid-gepulsten DC vor bzw. nach Kryokonservierung.

Figur 18D: zeigt den Vergleich der Expression von MAGE-1/HLA-A1 Komplexen (bestimmt mittels Antikörper gegen MAGE-1/HLA-A1 Komplex) vor und nach Kryokonservierung auf DC, welche auf verschiedene Art beladen wurden.

10

Figur 19 zeigt eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus von Beispiel 9, in dem Adenovirus infizierte dendritische Zellen mit oder ohne Kryokonservierung verglichen werden. Die Ergebnisse des Beispiels 9 sind in Figuren 20 bis 23 zusammengefasst.

15

Figur 20 zeigt die Wiedergewinnung von Adenovirus infizierten dendritischen Zellen nach Kryokonservierung. Die Wiedergewinnungsrate von adeno-GFP infizierten DC nach Einfrieren und Wiederauftauen versus Mock-treated (nicht-transfizierten) DC ist vergleichbar.

20

Figur 21: CD4-T-Zell stimulierende Aktivität von Adenovirus-infizierten dendritischen Zellen nach Kryokonservieren. Es kann gezeigt werden, dass die Kryokonservierung die allostimulierende Aktivität von Adenovirus-infizierten DC nicht verändert.

25

Figuren 22A und 22B zeigen, dass ein ähnlicher Phenotyp bei Adenovirus-infizierten DC mit oder ohne Kryokonservierung vorliegt.

30 Figuren 23A und 23B zeigen einen Phentypen von Adenovirus-infizierten DC mit oder ohne Kryokonservierung.

Figur 24 zeigt den schematischen Versuchsablauf von Beispiel 10 im Vergleich zu RNA-elektroporierten DC mit oder ohne Kryokonservierung. Die Ergebnisse sind in Figuren 25 bis 27 zusammengefasst.

Figur 25 zeigt, dass die Wiedergewinnung nach Kryokonservierung von EGFP-RNA-elektroporierter DC ähnlich ist wie in dem Kontrollexperiment.

- 5 Figur 26 zeigt, dass die Kryokonservierung die allostimulatorische Kapazität der EGFP-RNA-transfizierten DC nicht ändert.

Figur 27 zeigt, dass der Phenotyp von RNA-transfizierten DC ähnlich ist wie in dem Kontrollexperiment.

10

Figur 28 zeigt MHC-Klasse I- und II-restringierte Melanom- und Influenzavirus-peptide, die in dem Verfahren der vorliegenden Erfindung eingesetzt werden können.

Abkürzungen: AS = Aminosäuren, NT = Nukleotide, NP = Nukleoprotein, ana\* =  
15 analoges Peptid

<sup>a</sup> häufigster DR4-Subtyp, ungefähr 80 %

<sup>b</sup> häufigster DR4-Subtyp, ungefähr 80 %

- <sup>c</sup> Bis heute wurden 30 verschiedene HLA-DR13-Allele beschrieben. Es wurde Restriktion für DRB1\*1301 und DRB1\*1302 gezeigt, die zusammen 80 % der DR13-Allele ausmachen. Es ist möglich, dass auch andere DR13-Allele das Peptid prä-  
20 sentieren.

<sup>d</sup> Das Epitop wird durch dieses zweite HLA-DP4-Allel weniger effektiv präsentiert als durch das Allel DPB1\*0401.

- 25 Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, schränken sie jedoch nicht ein.

**Beispiel 1**

Es wurde die Überlebensrate von frisch hergestellten, unreifen DC und von durch verschiedene Reifungsstimuli gereiften DC bestimmt.

5 Folgende verschiedene Reifungsstimuli wurden getestet:

- Monozyten-konditioniertes Medium, hergestellt und verwendet wie beschrieben (Thurner et al. (1999) J. Immunol. Methods 223, 1)
- 10 ng/ml TNF $\alpha$
- 10 - 10 ng/ml TNF $\alpha$  + 1  $\mu$ g/ml PGE $_2$
- 10 ng/ml TNF $\alpha$  + 10 ng/ml IL-1 $\beta$  + 100 U/ml IL-6 + 1  $\mu$ g/ml PGE $_2$  ("Reifungscocktail")
- bis zu 1,0  $\mu$ g/ml LPS von Salmonella abortus equi
- doppelsträngige RNA (Poly I:C, 20  $\mu$ g/ml)
- 15 - 50 - 1000 ng/ml CD40L

Herstellung von aus Monozyten abgeleiteten DC aus PBMC: Als Komplettmedium wurde RPMI 1640 mit 20  $\mu$ g/ml Gentamicin, 2 mM Glutamin und 1 % hitzeinaktiviertem (56°C, 30 min) autologem humanem Plasma verwendet. Leukaphereseprodukte wurden als Monozyten-Separationsprodukte aus gesunden Zytapheresespendern hergestellt wie beschrieben (Thurner et al. (1999) J. Immunol. Methods 223, 1). Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) wurden dann durch Zentrifugation in Lymphoprep isoliert, und DC wurden aus Plastik-adhärrierenden Fraktionen der PBMC wie beschrieben hergestellt (Thurner et al. (1999) J. Immunol. Methods 223, 1). Dazu wurden unreife DC durch Kultur in Komplettmedium mit rekombinantem humanem GM-CSF (800 U/ml) und IL-4 (500 U/ml) erhalten. An Tag 6 wurden die verschiedenen, oben genannten Reifungsstimuli zu den DC gegeben, an Tag 7 wurden die reifen DC geerntet und für weitere zwei Tage in Abwesenheit von Cytokinen weiterkultiviert. Die Überlebensraten nach zwei Ta-

20

25

30

gen Kultur in Prozent der ausgesähten DC waren:

38,25 % für unreife DC,

76,2 % für (IL-1 $\beta$  + IL-6 + PGE $_2$  + TNF $\alpha$ )-gereifte DC,

13,5 % für TNF $\alpha$ -gereifte DC,

37,0 % für (TNF $\alpha$  + PGE $_2$ )-gereifte DC,

31,8 % für (Poly I:C)-gereifte DC und  
49,6 % für CD40L-gereifte DC (bei 500 ng/ml).

Die Unterschiede waren statistisch signifikant.

5

## Beispiel 2

Reife (Tag 7) DC wurden folgendermaßen eingefroren: DC wurden in Cryogefäßen resuspendiert in unterschiedlichen Konzentrationen (5, 20, 40, 60 und 100 x 10<sup>6</sup> pro ml) entweder in reinem autologem Serum oder in 20 % humanem Serumalbumin (HSA; bestehend aus 1000 ml Elektrolytlösung supplementiert mit 200 g humanen Plasmaproteinen mit wenigstens 95 % Albumin; DRK Blutspendedienst Baden-Württemberg, Baden-Baden, Deutschland). In die entstandene DC-Suspension wurde 1:1 mit den verschiedenen nachstehend beschriebenen Einfrierlösungen gemischt, dann sofort in ein 1,0 oder 1,8 ml Cryogefäß überführt. Unmittelbar danach wurden die Gefäße auf -80°C abgekühlt in einem "Cryo Freezing Container" (Nalgene Cryo 1°C Freezing Container, Abkühlgeschwindigkeit -1°C/min) und schließlich in die Gasphase von flüssigem Stickstoff überführt, wo sie bis zu sieben Monaten aufbewahrt wurden.

### 20 a) Einfriermedien

- HSA + DMSO ± Glukose [bestehend aus 20 % HSA-Lösung (siehe oben + 10, 15, 20 und 25 % (v/v) DMSO ± Glukose (Glukosteril 40 %<sup>TM</sup>, Fresenius, Deutschland, Wirkstoff: Glukosemonohydrat) zu 2, 4, 6, 10, 20 oder 30 % (v/v)];
- 25 - Serum + DMSO ± Glukose [reines autologes Serum + 20 % (v/v) DMSO ± Glukose zugesetzt zu 2, 4, 6, 10, 20 oder 30 %];
- Erythrocyte Freezing Solution<sup>TM</sup> [Erythrocyte Freezing Solution<sup>TM</sup> (Fresenius, Dreieich, Deutschland), bestehend aus 38 % Glycerol, 2,9 % Sorbitol und 0,63 % Natriumchlorid in sterilem Wasser];
- 30 - Cell Processing Solution<sup>TM</sup> + DMSO (Fresenius, Dreieich, Deutschland, bestehend aus 6 % Hydroxyethylstärke in 0,9 % Natriumchlorid, üblicher-

weise benutzt zur Sedimentation von Erythrozyten) + 10 oder 15 % (v/v) DMSO.

b) Auftaubedingungen

5 Zum Auftauen gefrorener reifer (Tag 7) DC wurden folgende vier Verfahren untersucht:

1. DC wurden in einem 56°C Wasserbad aufgetaut, dann ohne Waschen in 10 bis 20 ml eiskaltes Komplettmedium (supplementiert mit 800 U/ml GM-CSF und  
10 500 U/ml IL-4) in Teflonschalen (Rotilabo-Dosen, Roth, Karlsruhe, Deutschland) bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für zwei Stunden inkubiert, dann geerntet und 10 Minuten bei 150 g und 22°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen gezählt und wiederum auf Teflonschalen ausgesäht, in Komplettmedium mit GM-CSF und IL-4 (Zelldichte 1 x 10<sup>6</sup> pro ml) und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden  
15 die Zellen zur weiteren Verwendung geerntet.

2. Gefrorene reife (Tag 7) DC wurden wie unter 1 beschrieben aufgetaut, nach einer Ruheperiode von zwei Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> auf Teflonschalen wurden die Zellen geerntet (Zentrifugation 10 min bei 150 g und 22°C)  
20 zur weiteren Verwendung.

3. Gefrorene reife (Tag 7) DC wurden wie unter 1 beschrieben aufgetaut und nach einer Ruheperiode von zwei Stunden bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> auf Gewebekulturschalen (Falcon Bacton Dickinson Labware, New Jersey, USA) wurden die  
25 Zellen geerntet (Zentrifugation für 10 min bei 150 g und 22°C) zur weiteren Verwendung.

4. Gefrorene reife (Tag 7) DC wurden in einem 56°C Wasserbad aufgetaut, dann in 10 ml eiskalte "Hank's Balanced Salt Solution" (Bio Whitaker) gegeben  
30 und sofort für 12 min bei 133 g und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen zur weiteren Verwendung geerntet.

c) Ermittlung der DC Überlebensrate

Die Überlebensrate eingefrorener und wiederaufgetauter DC wurde durch Kultivierung in Kompletmedium ohne Zusatz von GM-CSF und IL-4 über wenigstens 4 Tage untersucht (= "Washout Test") und mit der Überlebensrate von DC verglichen, die frisch hergestellt worden waren aus nicht eingefrorenen oder gefrorenen Aliquots von PBMC wie beschrieben (Turner et al. (1999) J. Immunol. Methods 223, 1). Die jeweiligen Mengen an lebenden DC wurden durch einen Zellzähler (Cassy Cell Counter and Analyser System, Model TT, Schärfe System, Reutlingen, Deutschland; dieses System benutzt "Pulse area analysis" und erlaubt die Bestimmung von Zellzahlen, Zellgröße und Volumen sowie ob lebende Zellen vorliegen) und als Kontrolle ebenfalls durch Standard-Trypanblaufärbung bestimmt.

Zunächst wurde der Einfluß der DC-Konzentration untersucht, wobei Einfrieren bei  $10 \times 10^6$  reifen DC/ml die besten Ergebnisse lieferte. Das Ergebnis ist in Figur 1 dargestellt.

Weiterhin wurde der Einfluß der DMSO-Konzentration (5 bis 12,5 % v/v Endkonzentration) untersucht. Eine Veränderung der DMSO-Konzentration hatte keinen signifikanten Effekt auf die Überlebensrate aufgetauter DC.

Weiterhin wurde untersucht, ob HSA oder reines autologes Serum bessere Überlebensraten ergibt, sowie ob ein Zusatz von Glukose (Endkonzentrationen v/v von 1, 2, 3, 5, 10 und 15 %) die Überlebensrate verbessern. Das Ergebnis ist in Figur 2 dargestellt. Die Überlebensrate von DC nach mehreren Tagen wurde reproduzierbar erhöht, wenn HSA durch autologes Serum ersetzt wurde. Zusatz von Glukose in einer Endkonzentration von 5 % (v/v) verbesserte weiterhin die Ergebnisse.

Es wurden auch verschiedene kommerziell erhältliche Einfriermedien wie Erythrocyte Freezing Solution™ oder Cell Processing Solution (Fräsenius) untersucht. Diese lieferten jedoch schlechtere Ergebnisse als die bereits getesteten Einfriermedien.



Es wurden ebenfalls die verschiedenen unter b) genannten Auftaubedingungen überprüft, um den Streß, dem die Zellen nach dem Auftauen ausgesetzt sind, zu minimieren. Keine der vier getesteten Methoden zeigte eine klare Überlegenheit gegenüber den anderen.

5

Reife (Tag 7) DC wurden hergestellt wie in Beispiel 1 beschrieben und unter folgenden Bedingungen eingefroren:

Abkühlung 1°C pro min in reinem autologem Serum + 10 % DMSO + 5 % Glukose bei einer Zelldichte von  $10 \times 10^6/\text{ml}$ . Nach einer mindestens dreistündigen Aufbewahrung in der Gasphase von flüssigem Stickstoff wurden die Zellen aufgetaut. Nach dem Auftauen wurde der Prozentsatz an lebenden DC direkt bestimmt (= D7). Aliquots der DC wurden ausgesät und die Überlebensraten nach bis zu 4 Tagen in Kultur im Medium ohne Cytokine ("Washout Test") bestimmt wie in Beispiel 1c) dargestellt (n = 20). Das Ergebnis ist in nachstehender Tabelle dargestellt.

15

Ausbeute an gefrorenen/aufgetauten DC nach Auftauen (Tag 7) und in "Washout Tests" (Tage 8 bis 11)

Tage	Ausbeute in %	95 % Konfidenzintervall
7	93,3	100,0-85,8
8	74,1	81,7-66,6
9	63,3	70,8-55,7
10	55,8	63,4-48,2
11	47,1	57,9-36,2

20

### Beispiel 3

Optimal gereifte und eingefrorene DC sind frisch hergestellten DC gleichwertig im Hinblick auf Überlebensrate und T-Zell-stimulatorische Aktivität.

25

- a) Zunächst wurde untersucht, ob die Überlebensrate eingefrorener und wieder aufgetauter DC vergleichbar ist mit der Überlebensrate frisch herge-

stellter DC aus demselben Spender. Dazu wurde der "Washout Test" benutzt, wie er in Beispiel 2c) beschrieben ist. Das Ergebnis ist in Figur 3 dargestellt. Es wurde gefunden, dass kein Unterschied besteht zwischen aufgetauten DC und frisch hergestellten DC aus demselben Spender.

5

Es wurde ebenfalls die Morphologie und der Phänotyp aufgetauter DC mit frisch hergestellten DC verglichen. Die Morphologie der Zellen wurde unter einem Invert-Phasenmikroskop (Leika DM IRB, Leika Mikroskopie und Systeme GmbH, Wetzlar, Deutschland) untersucht und photographisch festgehalten. Der Phänotyp der Zellpopulationen wurde untersucht durch eine Reihe monoklonaler Antikörper und auf einem FACScan-Gerät untersucht (Becton Dickinson, New Jersey, USA) wie beschrieben (Turner et al. (1999) J. Immunol. Methods 223, 1). Tote Zellen wurden aufgrund ihrer Lichtstreuungseigenschaften aussortiert. Das Ergebnis ist in den Figuren 4 und 5 dargestellt. Gefrorene und wiederaufgetaute DC behalten ihre charakteristischen morphologischen Eigenschaften und ihren Phänotyp über mehrere Tage hinweg.

b) Sodann wurde untersucht, ob wiederaufgetaute DC auch ihre funktionalen Eigenschaften beibehalten.

1. Dazu wurde untersucht, ob wiederaufgetaute DC genauso effektiv wie frisch hergestellte, nicht eingefrorene reife DC primäre allogene MLRs induzieren können. Dieser Test wurde durchgeführt wie beschrieben (Turner et al. (1999), J. Immunol. Methods 223, 1). DC wurden in abgestuften Dosen zu  $2 \times 10^5$  allophenen T-Zellen pro Well in 96 Well-Platten mit flachem Boden gegeben und 4 bis 5 Tage in RPMI 1640 (supplementiert mit Gentamicin, Glutamin und 5 % allogenem hitzeinaktiviertem humanem Serum (Pool Serum)) co-kultiviert, und die Proliferation wurde durch Zugabe von  $^3\text{H}$ -Thymidin (4  $\mu\text{Ci}$  Endkonzentration/ml) für die letzten 12 bis 16 Stunden der Co-Inkubation bestimmt. Das Ergebnis ist in Figur 6 dargestellt. Eingefrorene und wiederaufgetaute DC induzieren primäre allogene MLRs genauso gut wie frisch hergestellte reife DC.

2. Es wurde auch untersucht, wie gut eingefrorene und

wiederaufgetaute DC zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) induzieren können. Dazu wurde die Induktion von IMP (Influenza Matrix Peptide)-spezifischen CTL durch IMP-gepulste reife DC gemessen. Dieser Ansatz ist spezifisch für reife DC, wenn er in Abwesenheit von T-Zellhilfe und exogenem IL-2 durchgeführt wird. Die Induktion von Influenza Matrix A2.1-Peptid (IMP) oder Melan-A A2.1-Peptid-spezifischen CD8+ T-Zellen wurde durchgeführt durch Stimulation gereinigter CD8+ T-Zellen (isoliert aus PBMC durch magnetische Zellsortierung/MACS mit CD8-Mikrokügelchen nach den Angaben des Herstellers, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) oder in anderen Experimenten von nichtadhärenten PBMC-Fraktionen mit DC (hergestellt aus autologem PBMC von HLA-A2.1+-Spendern), die entweder ungepulst oder gepulst waren mit HLA-A2.1-beschränktem IMP (GILGFVFTL [SEQ ID NO:1], 10 µM für 1 Stunde bei 37°C bei  $1 \times 10^6$  DC/ml Komplettmedium) oder Melan-A-analog Peptid (ELAGIGILTV [SEQ ID NO:2], 10 µM) bei einem DC/T-Verhältnis von 1:10 oder 1:30 für 7 Tage ohne Zugabe von Cytokinen. CTL wurden durch einen Standard-Lyse-Assay quantifiziert (Bhardwaj et al. (1994) J. Clin. Invest. 94, 797) oder durch Tetramerfärbung bei 37°C (Whelan et al. (1999) J. Immunol. 163, 4342). Zielzellen für den Standard-4 Stunden- $^{51}\text{Cr}$ -Release Assay, der bei verschiedenen Effektor/Zielzellverhältnissen durchgeführt wurde, waren IMP-gepulste (10 µg/ml für 1 Stunde bei 37°C) T2A1-Zellen, nichtgepulste T2A1-Zellen und K562-Zielzellen (alle  $^{51}\text{Cr}$ -markiert). Alle Versuche wurden mit einem 80-fachen Überschuß an K562-Zellen durchgeführt, um die natürliche Killerzellaktivität zu blockieren. Die spezifische Lyse in % wurde berechnet durch die Formel (spezifische Freisetzung - spontane Freisetzung)/(maximale Freisetzung - spontane Freisetzung) x 100. Lösliche IMP- und Melan-A/HLA A2.1-Tetramere wurden hergestellt, und die Bindung an T-Zellen wurde analysiert durch Durchflußzytometrie bei 37°C wie beschrieben (Whelan et al., 1999). 1 µl Tetramer (0,5 bis 1 mg/ml) wurde zu  $2 \times 10^6$  Zellen in etwa 60 µl (zurückbleibendes Volumen im Gefäß nach Zentrifugation und Abgießen des Überstands) Medium, bestehend aus RPMI 1640, mit Gentamicin, Glutamin und 5 % allogenem hitzeinaktivierten humanem Serum (Pool Serum) supplementiert, für 15 min bei 37°C gegeben. Anschließend wurden die Zellen ohne Waschen abgekühlt und für

15 min mit einem dreifach gefärbten monoklonalen Antikörper gegen humanes CD8 (Caltag Laboratories, Burlingame, Kalifornien) auf Eis inkubiert. Nach drei Waschschritten

5 wurden die Zellen auf einem FACScan-Gerät analysiert (Becton Dickinson).

Das Ergebnis ist in den Figuren 7 und 8 dargestellt.

10 Einfrieren und Auftauen von DC ändert nicht die Fähigkeit reifer DC eine starke IMP-spezifische CLT-Antwort zu induzieren. Einfrieren und Auftauen ändert ebenfalls nicht die Fähigkeit reifer DC, starke IMP-spezifische CD8+-T-Zellantworten zu induzieren, wie durch die HLA-A2.1/Peptid Tetrameranalyse gezeigt.

15 Diese Versuche zeigen, dass nach Einfrieren und Auftauen lebende DC erhalten wurden, die vollkommen gleichwertig zu frisch hergestellten DC sind.

#### Beispiel 4

20 Um eine erhöhte Überlebensrate der eingefrorenen und wieder aufgetauten DC zu erreichen, wurden die folgenden verschiedenen anti-apoptotischen Stimuli in verschiedenen Konzentrationen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu den DC gegeben:

1. Rekombinantes murines oder menschliches trimeres TRANCE (Wong et al. (1997) J. Exp. Med. 186, 2075) zu 100, 200, 500 ng/ml;
- 25 2. RANKL (Anderson et al. (1997) Nature 390, 175) zu 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml und 1 µg/ml;
3. Trimeres, lösliches CD40L (Morris et al. (1999) J. Biol. Chem. 274, 418) zu 50, 100 und 500 ng/ml.

30 Die DC wurden den verschiedenen anti-apoptotischen Stimuli bei 37°C über Nacht für die letzten 12-16 h der Kultur vor dem Einfrieren, für 4 h vor dem Einfrieren (Zelldichte  $1 \times 10^6$  in Kompletmedium mit GM-CSF und IL-4) und ebenfalls für 4 h nach dem Auftauen (Zelldichte  $1 \times 10^6$  in Kompletmedium mit GM-CSF und IL-4) ausgesetzt.

Eine kurzzeitige Exposition aufgetauter DC mit den anti-apoptotischen Stimuli war genauso wirksam wie die DC-Behandlung vor dem Einfrieren und ergab eine erhöhte Überlebensrate, die allerdings oft erst nach 3 Tagen im "Washout test" sichtbar wurde. CD40L (Figur 9) und TRANCE/RANKL (Ergebnisse nicht gezeigt) ergaben ähnliche Resultate. Die Ergebnisse zeigen, dass Zugabe von CD40L oder TRANCE/RANKL die Überlebensrate von DC über Tag 3 hinaus verbessert.

### Beispiel 5

- Um zu untersuchen, ob DC vor dem Einfrieren erfolgreich mit Antigen beladen werden können, wurden DC mit Tetanus Toxoid (TT) (als Beispiel für ein Protein-Antigen) oder mit IMP (als Modellpeptid) beladen. Zum Pulsen mit TT wurden DC aus frischen oder eingefrorenen Aliquots von PBMC aus Leukaphereseprodukten hergestellt (s. o.). TT wurde den unreifen Zellen an Tag 5 zu 10 µg/ml zugesetzt. Reife DC wurden an Tag 7 geerntet und entweder uneingefroren oder nach Einfrieren und Auftauen (nach 4 h) auf ihre Fähigkeit hin untersucht, TT-spezifische proliferative Antworten in PBMC zu induzieren. Dazu wurden abgestufte Dosen an ungepulsten und TT-gepulsten DC zu PBMC ( $10 \times 10^4$ /well) gegeben und an Tag 5 mit  $^3\text{H}$  Thymidin gepulst wie beschrieben (Thurner et al. (1999) J. Immunol. Methods 223, 1). Zur Beladung mit IMP wurden DC mit 10 µM Peptid (für 1 h, 37°C,  $1 \times 10^6$  DC/ml Komplettmedium) gepulst entweder vor dem Einfrieren oder nach dem Auftauen. Die Fähigkeit, IMP erfolgreich zu präsentieren, wurde getestet wie obenstehend beschrieben.
- Eingefrorene, TT-gepulste DC waren genauso stimulatorisch wie frisch hergestellte, TT-gepulste DC (Figur 10). Sowohl vor dem Einfrieren als auch nach dem Auftauen IMP- bzw. Melan A-beladene DC stimulierten gleich gut IMP- bzw. Melan A-spezifische CTL (Figuren 8 und 11). Diese Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, eingefrorene Aliquots reifer DC herzustellen, die bereits mit Antigen beladen sind und nach dem Auftauen unmittelbar verwendet werden können.

### Beispiel 6

Es wurde bei Stadium IV Melanom-Patienten eine Vakzination mit Peptid- und Protein-beladenen DC, welche nach den hier dargestellten Verfahren hergestellt

und mit Antigen beladen wurden, durchgeführt. Figur 12 zeigt die Induktion einer Helferzell Typ 1 Antwort gegen KLH in allen vakzinierten Patienten. Die Patienten erhielten jeweils nur eine einzige subkutane Gabe von 4 Mio. reifen DC, welche aus Leukopheresaten unter Verwendung von GM-CSF und Interleukin-4 und der Reifungszusammensetzung wie in der Anmeldung geschildert, hergestellt wurden (z. B. Figur 1 und 3). Es wurde hierbei das Kontrollantigen KLH in einer Konzentration von 10 µg/ml gleichzeitig mit der Reifungszusammensetzung zugegeben und die DC dann portioniert eingefroren. Vor der Vakzination und 14 Tage nach der einmaligen Verabreichung von 4 Mio. DC wurde Blut entnommen und mittels Standard-Elispot-Assay (Zugabe von 10 µg/ml KLH zu 500.000 PBMC und Messung der Anzahl der Interferon-γ oder IL-4 produzierenden Zellen; der Hintergrund ohne Zugabe von KLH ist nahezu 0). Es zeigt sich, dass vor der Vakzination weder Interferon-γ noch Interleukin-4 nach KLH-Präsentation produziert wird, wogegen 14 Tage nach der einmaligen Impfung mit den KLH beladenen DC in allen Patienten Interferon-γ, aber nicht oder nur minimal Interleukin-4 produzierende T-Zellen induziert wurden (in Kontrollexperimenten wurde durch Entfernen der CD4-Zellen aus den PBMC gezeigt, dass es sich bei den reaktiven Zellen um CD4-positive Helfer-T-Zellen handelt).

## 20 Beispiel 7

Ein Patient aus der Studie von Beispiel 6 erhielt mehrere Vakzinationen mit DC, wobei jeweils 4 Mio. wieder aufgetaute DC mit den in Figur 13, 14 bzw. 15 angeführten Peptiden beladen (d. h. pro 4 Mio. DC jeweils nur 1 Peptid) und subkutan injiziert wurden. Jeweils vor der ersten Impfung und 14 Tage nach der jeweils vorangehenden Impfung und unmittelbar vor der nächsten Impfung wurde Blut entnommen und ein Standard-Elispot-Assay durchgeführt wie in Thurner et al. (1999), J. Exp. Med. 190, 1669-1678 unter Material und Methoden beschrieben. Die für die Vakzination verwendeten DC wurden wie in der Legende zu Figur 8 und 11/in Beispiel 5 geschildert hergestellt und erst nach dem Auftauen mit den entsprechenden Peptiden beladen. Wie aus den Figuren 13 bis 15 ersehen werden kann, wird gegenüber mehreren Klasse-I- (Figuren 13 und 14) und Klasse-II-Peptiden (Figur 15) Immunität induziert. Die Charakteristika der verwendeten Peptide sind Tabelle I zu entnehmen. Anzumerken ist, dass der HLA-Typ des speziellen Patienten HLA-A 2.1+ und HLA-A3+ ist sowie HLA-DR 13+,

HLA-DP4+ (aber DR4-). Figur 13 zeigt die Induktion von Immunität gegen die Influenza-peptide NP-A3 und IMP-A2 nach einer einzigen Impfung (Nr. 2 bedeutet Blutentnahme und Elispot-Messung kurz vor Verabreichung der Vakzination Nr. 2) und zeigt einen Anstieg nach einer weiteren Impfung, aber keine Änderung bei EBV-A2 und IV-9-A2 Peptiden, welche zur Impfung nicht verwendet wurden. Figur 14 zeigt eine Induktion der Immunität gegen 4 Klasse-I-restringierte Tumor-peptide, deutlich und zweifelsfrei gegen das Peptid Melan A-A2.1. Figur 15 zeigt eine Induktion von Immunität gegen zwei Klasse II-restringierte Tumorpeptide (Mage 3-DR13 und -DP4), nicht aber gegen Tyrosinase-DR4 und GP 100 DR4 (dies stellt eine Negativkontrolle dar, da der Patient DR4 negativ war und die DC somit nicht mit diesen Peptiden beladen werden konnten).

### Beispiel 8

Kryokonservierung von Dendritischen Zellen nach der Antigenbeladung mit Tumorzellpräparationen (Tumor-Zell-Lysate, Nekrotische oder apoptotische Tumorzellen)

Dendritische Zellen (DC) können in großer Menge aus Leukapheresen generiert werden. Es wurde eine Methode zur Kryokonservierung reifer DC entwickelt, die erlaubt die portionierte Verwendung dieser Zellen zur Vakzination erlaubt. Bisher wurden die reifen DC vor der Anwendung mit Peptiden beladen, die den immunodominanten Sequenzen von Tumor assoziierten Antigenen (TAA) entsprechen. In den hier beschriebenen Versuchen (siehe Figur 16) wurden überprüft, ob unreife DC, die mit verschiedenen Tumorzellpräparationen beladen und anschließend gereift wurden, ebenfalls kryokonserviert werden können.

Tumorzellpräparation: Zur Herstellung der Tumorzellpräparationen wurde die Mel526 Melanomzelllinie verwendet. Mel526 Zellen wurden in RPMI gewaschen und durch repetetive Erhitzung auf 57°C und anschließende Kühlung im Flüssigstickstoff behandelt. Anschließend wurde das Zellmaterial mit Hilfe eines Ultraschallgerätes zertrümmert. Da durch die Erwärmung/Einfrierzyklen Nekrose induziert wird, wird diese Art der Tumorzellpräparation, die sämtliche Zellbestandteile enthält, im Folgenden nekrotisches Zellmaterial genannt. Um Lysat zu gewinnen haben wir an diese Schritte eine Ultrazentrifugation angeschlossen um Zellbestandteile zu entfernen und eine Aufreinigung der Proteine im Centricon-Zentrifu-

gationstube durchgeführt. Wir haben nach den Ergebnissen der Bradford Analyse die Proteinfraction mit der höheren Aktivität, nämlich die  $\geq 10$  KDa. verwendet. Apoptotische Tumorzellen wurden mit einem Breitspektrum UVB Bestrahlungsgerät induziert und mit einem Annexin V Test verifiziert.

- 5 Generierung der DC: DC wurden entsprechend der in der Experimentellen Immuntherapie verwendeten Technik aus Leukapheresen generiert. PBMC wurden in Nunc Cell Factories ausgeplated und mit RPMI (1 % autologes, hitzeinaktiviertes Plasma) substituiert mit 1000 IU/ml GM-CSF und 500 IU/ml IL-4 kultiviert. Am Tag 5 wurden die dann unreifen DC verwendet und für 4 Stunden mit den
- 10 geschilderten Tumorzellpräparationen beladen in einer Konzentration von 1 : 1.

Beladung: Die Beladung erfolgte in einem 5 ml Polypropylene Reaktionsgefäß bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Nach der Beladung wurden die DC in 12 ml Tissue culture plates ausgeplated und mit einem Maturationscocktail bestehend aus TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und PGE<sub>2</sub> für 24 h kultiviert.

- 15 Einfrieren/Auftauen: jeweils die Hälfte der jeweils beladenen DC wurde entsprechend der beschriebenen Methode (Feuerstein B. et al., J. Immunol. Methods 245: 15-29 (2000)) in 1,8 ml Nunc freeze vials bei -80 °C für 3 Stunden kryokonserviert. Danach wurden die Zellen wiederum entsprechend der beschriebenen Methode aufgetaut und für eine Stunde im RPMI Medium bei 37 °C und 5
- 20 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Anschließend wurde diese Fraktion der DC wie die nicht eingefrorene Fraktion analysiert und für weitere Versuche verwendet.

Der beschriebene Versuchsaufbau ist als Flussdiagramm in Figur 16 dargestellt.

- Zellzahl und Viabilität: Die Gesamtzellzahl und die Viabilität der DC nach der Durchführung der geschilderten Beladung und der Kryokonservierung wurde mit
- 25 Trypan Blau im Mikroskop bestimmt. Anfänglich werden  $5 \times 10^5$  DC verwendet. Wir fanden vergleichbare Zellzahlen und keinen Unterschied in der Viabilität der beladenen und kryokonservierten DC im Vergleich zu den nicht kryokonservierten Zellen (Figur 17A, 18A). Eine Abnahme der Zellzahl durch die Beladung, *nicht* aber durch die Kryokonservierung, insbesondere mit nekrotische Zellen war zu
- 30 beobachten.

Funktionalität: Zur Testung der funktionellen Kapazität wurde ein Mixed-Leukocyte-Reaction-Test (MLR) durchgeführt. Die beladenen DC wurden in einem allogenen MLR eingesetzt (4 Tage Inkubation mit allogenen Leukozyten) und dann mit radioaktivem Thymidin (<sup>3</sup>H-Thymidin) für 13 Stunden gepulst. Es ergaben



sich vergleichbare allostimulatorische Potenzen für kryokonservierte und nicht kryokonservierte beladene DC (Figur 17B, 18B).

Phänotyp: Zur Beurteilung der Expression der für die Antigenpräsentation und den Funktionszustand der DC relevanten Oberflächenmoleküle wurde eine FACS-Analyse mit den entsprechenden Antikörpern durchgeführt. Es wurden eine ver-  
gleichbares Oberflächenexpressionsmuster sowohl für die verschiedenen Bela-  
dungsmethoden als auch nach der Kryokonservierung gefunden (Figur 17C).

Direkter Antigennachweis: Zum direkten Nachweis von tumoralem Antigen wurde ein Antikörper eingesetzt, der MAGE-1 im HLA-A1 Kontext d. h. den Komplex aus  
10 Mage-1 Peptid und dem HLA-A1 Molekül erkennt. Die verschieden beladenen DC wurden mit diesem Antikörper gefärbt und im FACS analysiert. Dabei zeigte sich bei Verwendung von peptidbeladenen (20µg MAGE-1 Peptid für 3 Stunden/ml) DC, dass nach der Kryokonservierung ein vergleichbarer Prozentsatz von MAGE-1/A1 Antigen nachweisbar war wie ohne Kryokonservierung (Figur 18C). Aus die-  
15 sem Versuch lässt sich schließen, dass die Kryokonservierung nicht zu einem Antigenverlust führt.

In einem weiteren Versuch wurden der MAGE-1/A1 Antikörper angewendet, um die Effektivität der verschiedenen Beladungsmethoden zu bestimmen. Mit den Tumorzellpräparationen (die verwendete Melanomzell-Linie exprimiert das Mage-  
20 1 Antigen) konnte eine signifikante Beladung erreicht werden, die etwa 20 % der Antigendichte des Peptidpulsens erreichte (Figur 18D). Dabei war die Expression des MAGE-1/HLA-A1 Komplexes vor und nach Kryokonservierung in vergleichbarer Quantität nachweisbar (errechnet als Positivität gegen den Hintergrund unbeladener DC).

Schlussfolgerung: Es konnte also gezeigt werden, dass das Verfahren der vorlie-  
genden Erfindung nicht nur eine effektive Kryokonservierung unbeladener, mit Peptid oder Protein beladenener DC erlaubt (wie in Beispiel 1-7 gezeigt), sondern auch eine ebenso effektive von DC, welche mit (Tumor-) Zellpräparationen  
30 (simplen nekrotischen Tumorzellen, aus Tumorzellen hergestellten Lysaten oder apoptotischen Tumorzellen) beladen wurden. Effektiv bedeutet, dass durch das Einfrieren i) der Zellverlust nach dem Auftauen  $\leq 25$  % im Vergleich zu nicht eingefrorenen DC beträgt, ii) die aufgetauten DC eine vergleichbare T Zell-Stimulatorische Kapazität aufweisen wie die nicht eingefrorenen DC (getestet in der allo-

genen MLR) und iii) die Oberflächen-Expression von Antigenen bzw. Liganden für T Zell-Rezeptoren (d. h. spezifische MHC-Peptidkomplexe) nach dem Einfrier- und Auftauvorgang erhalten bleibt (modellhaft gezeigt durch direkten Nachweis eines bestimmten Peptid/MHC-Komplexes, nämlich des MAGE-1/HLA-A1-Komplexes, mittels eines diesen Komplex spezifisch erkennenden monoklonalen Antikörpers).

### Beispiel 9

Kryokonservierung von Dendritischen Zellen nach der Antigenbeladung mittels adenoviraler Transfektion

Mit Adenoviren transfizierte Dendritischen Zellen können mittels dem erfindungsgemäßen Verfahren so eingefroren werden, dass die Eigenschaften der Dendritischen Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten Dendritischen Zellen vergleichbar sind. Hierzu wurden reife DC bei einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 500 für 2 Stunden mit einem Adenovirusvektor (AD5) infiziert, der eine für das "Green Fluorescent Protein" (GFP) kodierende cDNA enthält. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen bei einer Konzentration von  $10 \times 10^6$  DC/ml im HSA und 10 % DMSO in 5 % Glukose (Endkonzentration) eingefroren und für 4 Stunden aufbewahrt. Nach Auftauen wurde die Lebensfähigkeit der Zellen durch Trypanblau-Exklusion bestimmt. Die Wiedergewinnungsrate von lebensfähigen Zellen ist in Figur 20 als Prozentsatz der eingefrorenen DC angegeben.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die allostimulatorische Aktivität von Adenovirus-infizierten DC durch Kryokonservierung nicht verändert wird. Hierzu wurden reife DC mit Adeno-GFP bei einem MOI von 500 infiziert und kryokonserviert, wie vorstehend beschrieben. Nach Wiederauftauen und einer Kulturperiode von 24 oder 72 Stunden wurden die dendritischen Zellen mit allogenen CD4+-T-Zellen ( $2 \times 10^5$  pro Napf) unter den in Fig. 21 angegebenen Verhältnissen co-kultiviert. Nach 4 Tagen wurden die Zellen mit [ $^3$ H]-Thymidin für 16 Stunden gepulst und der Einbau der Radioaktivität wurde bestimmt. In Fig. 21 sind die Durchschnittswerte von drei Zählungen mit der entsprechenden Standardabweichungen angegeben. Die Werte von T-Zellen allein oder DC allein waren immer weniger als 1000 pro min.

Weiterhin wurden reife DC mit Adeno-GFP bei einem MOI von 500, wie vorstehend beschrieben, kryokonserviert. Nach Wiederauftauen und der angegebenen Kulturzeit wurden die Zellen unter Verwendung von für CD83, CD25, CD86, CD80  
5 spezifischen Antikörpern, gefolgt von PE-konjugiertem Ziegen/Maus-IG-(Fab')<sub>2</sub>-Fragmenten gegengefärbt. Die Ergebnisse sind in Fig. 22A gezeigt. Bei einem vergleichbaren Versuch unter Verwendung von für HLA Klasse 1, HLA-DR und CD40 spezifischen Antikörpern, wurden die in Fig. 22B gezeigten Ergebnisse erhalten.

10

### Beispiel 10

Kryokonservierung von Dendritischen Zellen nach der Antigenbeladung mittels RNA-Transfektion. Mit RNA transfizierte Dendritischen Zellen können mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens so eingefroren werden, dass die Eigenschaften  
15 der Dendritischen Zellen im Vergleich zu nicht transfizierten Dendritischen Zellen vergleichbar sind. Die DC können in unreifem Stadium mit RNA transfiziert – dann gereift – und als reife DC dann eingefroren werden (nicht gezeigt). Bevorzugt werden bereits reife DC mit RNA transfiziert und kryokonserviert. Die Ergebnisse sind in Figuren 25 bis 27 zusammengefasst.

20

Hierzu wurden reife dendritische Zellen zweimal mit RPMI gewaschen und einmal in einer Waschlösung des Optimix-Kits (EQUIBIO, Maidstone Kent, UK). DC wurden auf eine Endkonzentration von  $40 \times 10^6$  DC/ml in Optimix-Medium gebracht. Es wurden dann 0,1 ml der Zellsuspension mit 40 µg *in-vitro*-transkribierter  
25 EGFP-RNA in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vermischt. Nach Inkubierung bei Raumtemperatur für maximal 3 min wurde die Zellsuspension in eine 0,4 cm Spalt-Elektroporationsküvette transferiert und bei einer Spannung von 260 V und einer Kapazität von 150 µF mit dem Gene-Pulser II (Biorad, München, Deutschland) gepulst. Kontroll-DC wurden ohne die Zugabe von RNA gepulst. Die Zellen  
30 wurden bei einer Konzentration von  $10 \times 10^6$  DC/ml in HSA (mit 10 % DMSO und 5 % Glukose (Endkonzentration)) eingefroren und 4 Stunden gelagert. Nach Auftauen wurde die Lebensfähigkeit der Zellen durch Trypanblau-Exklusion bestimmt. Die Wiedergewinnung von lebensfähigen Zellen ist in Figur 25 als Prozentsatz der eingefrorenen DCs angegeben.

Reife DC wurden mit EGFP-RNA elektroporiert und kryokonserviert, wie vorstehend beschrieben. Nach Wiederauftauen und einer Kulturperiode von 48 Stunden wurden die dendritischen Zellen mit allopathen CD4+-T-Zellen ( $2 \times 10^5$ /Napf) bei den in Fig. 26 angegebenen Verhältnissen co-kultiviert. Nach 4 Tagen wurden die Zellen mit [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin für 16 Stunden gepulst und der Einbau der Radioaktivität wurde bestimmt. In Fig. 26 sind die Mittelwerte bei dreifachen Messung (mit Standardabweichung) gezeigt. Die Zahlen von T-Zellen allein oder DC alleine waren weniger als 1000 pro min.

Kryokonservierung von RNA-elektroporierten DC ändert nicht den phenotypischen DC-Marker. Hierzu wurden reife DC elektroporiert, mit oder ohne EGFP-RNA und kryokonserviert, wie vorstehend beschrieben. Nach Wiederauftauen und einer Kultivierungsperiode von 48 Stunden wurden die DC gegengefärbt mit den in Fig. 27 angegebenen Maus-monoklonalen Antikörpern und PE-konjugierten Antimaus-Ig-(Fab')<sub>2</sub>-Fragmenten gefolgt durch FACS-Analyse. Die Zahlen in Figur 27 betreffen im rechten unteren Teil des Quadrats die EGFP-positiven DC, im oberen rechten Teil die EGFP/DC-Marker-doppelpositiven DC.

**Patentansprüche:**

1. Verfahren zur Herstellung gebrauchsfertiger, kryokonservierter, reifer dendritischer Zellen, umfassend
  - 5 a) Bereitstellen von unreifen dendritische Zellen (DC) ;
  - b) Kultivieren der unreifen DC in einem Kulturmedium, das einen Reifungscocktail mit einem oder mehreren Reifungsstimuli enthält, unter Erhalt von reifen DC;
  - 10 c) Einfrieren der reifen DC in einem Einfriermedium, das kein heterologes Serum enthält.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die DC vor dem Einfrieren oder nach Wiederauftauen der eingefrorenen DC mit einem Antigen oder einem Antigen-Antikörperkomplex beladen werden.
- 15 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei
  - (i) die unreifen DC aus CD14-positiven, mononuklearen Zellen (Monozyten) oder aus CD34-positiven Zellen hergestellt werden; und/oder
  - (ii) die unreifen DC direkt aus dem Blut isoliert werden; und/oder
  - 20 (iii) die unreifen DC oder deren Vorläuferzellen aus Leukapheresaten gewonnen werden; und/oder
  - (iv) die unreifen DC oder deren Vorläuferzellen aus Frischblut oder Knochenmark gewonnen werden.
- 25 4. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Reifungsstimuli ausgewählt sind aus IL-1 wie IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , Prostglandine wie PGE<sub>2</sub>, IFN- $\alpha$ , Lipopolysacchariden und andere bakterielle Zellprodukte wie z. B. MPL (Monophosphoryllipid A) und Lipoteichonsäure, Phosphorylcholin, Calciumionophore, Phorbolster wie PMA, Heat-Schock-Proteine, Nukleotide wie ATP,
- 30 Lipopeptide, künstliche Liganden für Toll-ähnliche Rezeptoren, doppelsträngige RNA wie z. B. Poly-I:C, immunstimulatorische DNA-Sequenzen, CD40-Ligand usw. enthält, insbesondere das Kulturmedium oder der Reifungscocktail IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE<sub>2</sub> und TNF $\alpha$  enthält oder der Reifungscocktail Monocyten-konditioniertes Medium (MCM) oder MCM mit zusätzlichem PGE<sub>2</sub> ist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, wobei die unreifen DC in Gegenwart von 0,1 bis 100 ng/ml IL-1 $\beta$ , 0,1 bis 100 ng/ml IL-6, 0,1 bis 10  $\mu$ g/ml PGE<sub>2</sub> und 0,1 bis 100 ng/ml TNF- $\alpha$  kultiviert werden.
- 5
6. Verfahren nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirkstoffe IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE<sub>2</sub> und TNF $\alpha$ , die den DC zur Ausreifung zugesetzt werden, aus gereinigten Zubereitungen der einzelnen Wirkstoffe stammen.
- 10 7. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6, wobei
- (i) die Reifung für wenigstens 1 Stunde, vorzugsweise wenigstens 6 Stunden, erfolgt und/oder
- (ii) während der Reifung der Reifungscocktail des Kulturmediums ausgetauscht wird und/oder zusätzliche Reifungsstimuli dem Kulturmedium zugegeben werden;
- 15 und/oder
- (iii) dem Kulturmedium Immun-/Reifungsmodulatoren, insbesondere ausgewählt aus IL-10, Fumarsäure und Ester davon, Mycophenolatmofetil und Vitamin D3, zugegeben werden.
- 20 8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Einfriermedium
- (i) 5 bis 25 % (v/v) eines oder mehrerer Gefrierschutzmittel, die insbesondere ausgewählt sind aus DMSO, Glycerin, Polyvinylpyrrolidon, Polyethylenglykol, Albumin, Cholinchlorid, Aminosäuren, Methanol, Acetamid, Glycerinmonoacetat und
- 25 anorganische Salze und das besonders bevorzugt DMSO enthält und/oder
- (ii) 2 bis 30 % (w/v) einer oder mehrerer Polyolverbindungen, die insbesondere ausgewählt sind aus Glukose Dextran, Sucrose, Ethylenglykol, Erythrit, D-Ribit, D-Mannit, D-Sorbit, Inosit und D-Laktose und besonders bevorzugt Glukose ist; und/oder
- 30 (iii) 2 - 90 % (w/v) einer nicht heterologen Serumkomponente, insbesondere autologes Serum oder Plasma oder allogenenes Serum oder Plasma, und besonders bevorzugt humanes Serumalbumin, autologes Serum, allogenenes humanes Serum oder Poolserum enthält.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  bis  $100 \times 10^6$  Zellen/ml eingefroren werden.
- 5 10. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 9, wobei die DC vor dem Einfrieren mit Antigen oder Antigen-Antikörperkomplexen beladen werden.
- 10 11. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 10, wobei das Antigen, mit dem die DC beladen werden, ein Protein oder ein Fragment davon mit wenigstens 8 Aminosäuren ist und insbesondere das Protein oder Fragment in einer Konzentration von 0,01 bis 1000  $\mu\text{M}$  zum Kulturmedium gegeben wird, vorzugsweise während IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE<sub>2</sub> und TNF $\alpha$  im Kulturmedium enthalten sind.
- 15 12. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 10, wobei die DC mit einem DNA- oder RNA-Molekül beladen werden, das für das Antigen kodiert.
- 20 13. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 2 bis 10, wobei in dem Antigen-Antikörperkomplex als Antigen ein Proteinfragment, Zellen oder Zellbruchstücke oder Nukleinsäuresequenzen dienen und der Antikörper aus der Klasse IgG oder IgE ist.
- 25 14. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13, wobei die DC vor dem Einfrieren oder nach dem Auftauen mit einem Molekül in Kontakt gebracht werden, das die Apoptose hemmen kann, wobei das Molekül, das die Apoptose hemmen kann, vorzugsweise ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus CD40-Ligand, TRANCE und RANKL.
- 30 15. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, wobei nach Einfrieren und Auftauen der DC mehr als 75 %, bevorzugt mehr als 85 % überlebende DC erhält, bezogen auf die Anzahl eingefrorener DC.

16. Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 15, wobei das Verfahren zur Herstellung eines Impfstoffs aus reifen kryokonservierten PC geeignet ist.

5 17. Verfahren zum Auffinden vorteilhafter Bedingungen zum Einfrieren von DC, umfassend die Schritte:

a) Bereitstellen unreifer DC;

b) Kultivieren verschiedener Ansätze der unreifen DC in Gegenwart verschiedener Reifungsstimuli;

10 c) anschließendes Kultivieren der DC in Medium mit oder ohne Cytokine, wobei ein Kultivieren ohne Cytokine bevorzugt ist;

d) Bestimmen des Anteils lebender Zellen nach wenigstens 1 Tag Kultur in dem Medium mit oder ohne Cytokine; und

15 e) Ermitteln des Reifungsstimulus, der die höchste Überlebensrate ergeben hat.

18. Verfahren nach Anspruch 17, wobei nach wenigstens 2 Tagen, bevorzugt nach wenigstens 3 Tagen Kultur in dem Medium mit oder ohne Cytokine der Anteil lebender Zellen bestimmt wird.

20

19. Gefrorene, reife, mit Antigen beladene dendritische Zellen.

20. Zellen gemäß Anspruch 19, die nach einem Verfahren gemäß dem Verfahren nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 16 erhältlich sind.

25

21. Impfstoff, umfassend dendritische Zellen nach Anspruch 19 oder 20.

30



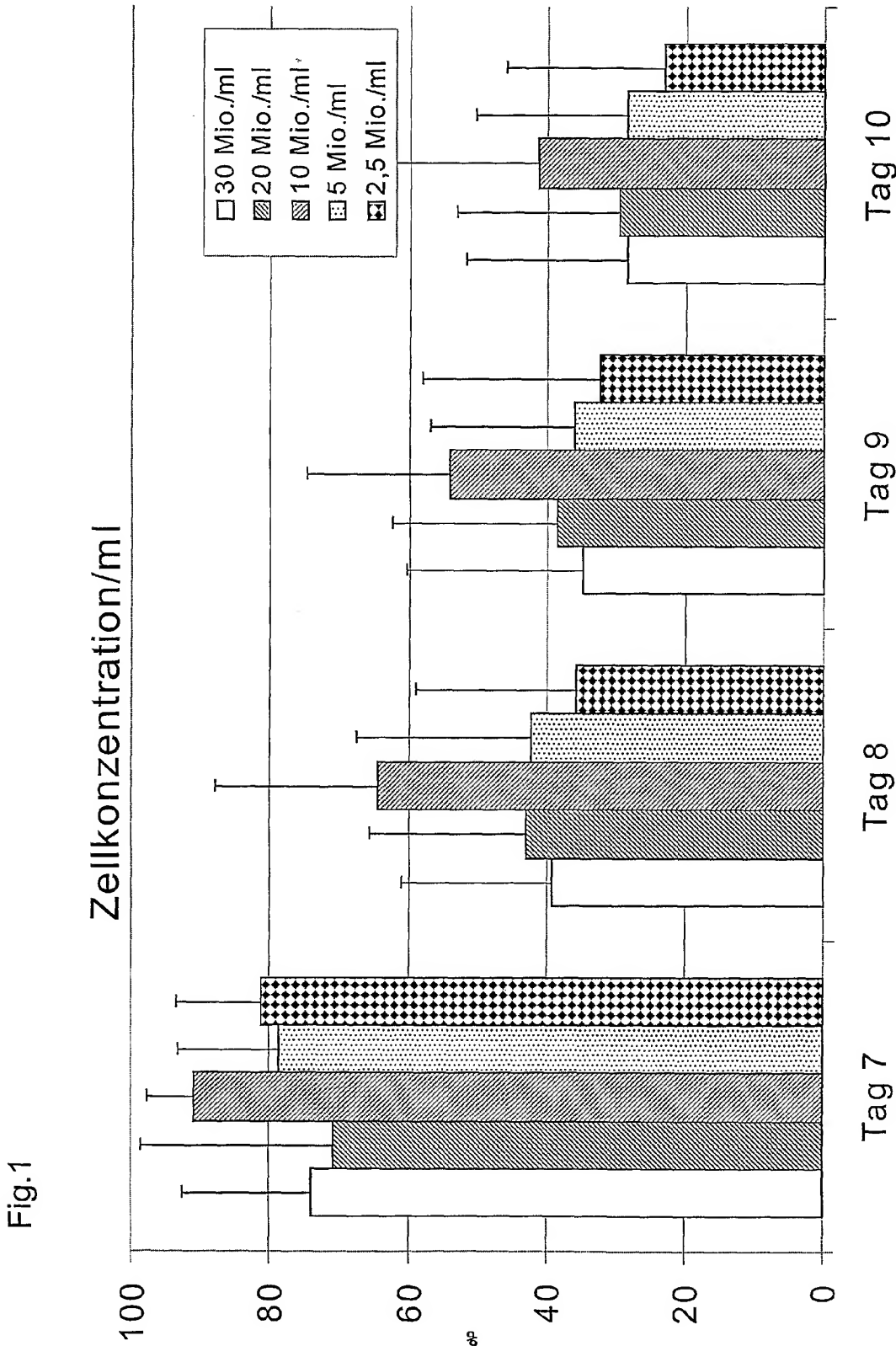


Fig.2

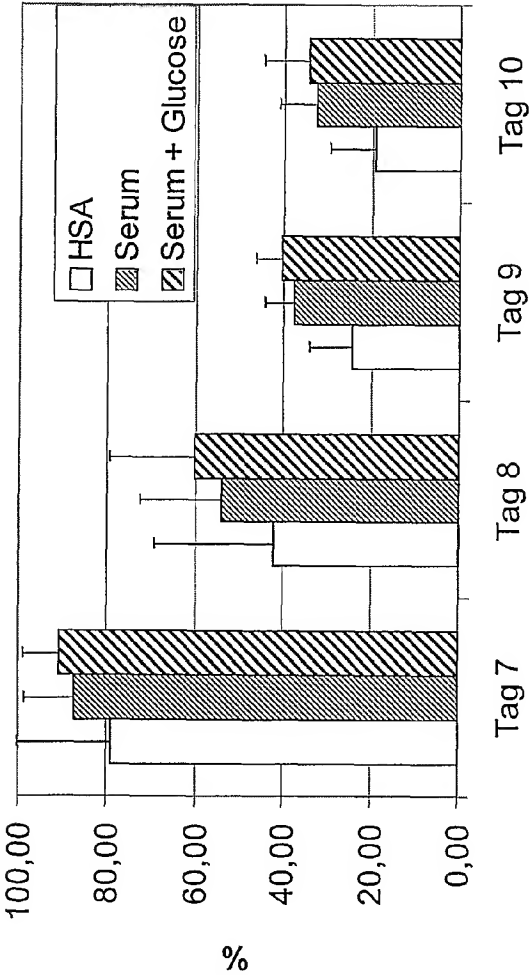


Fig. 3

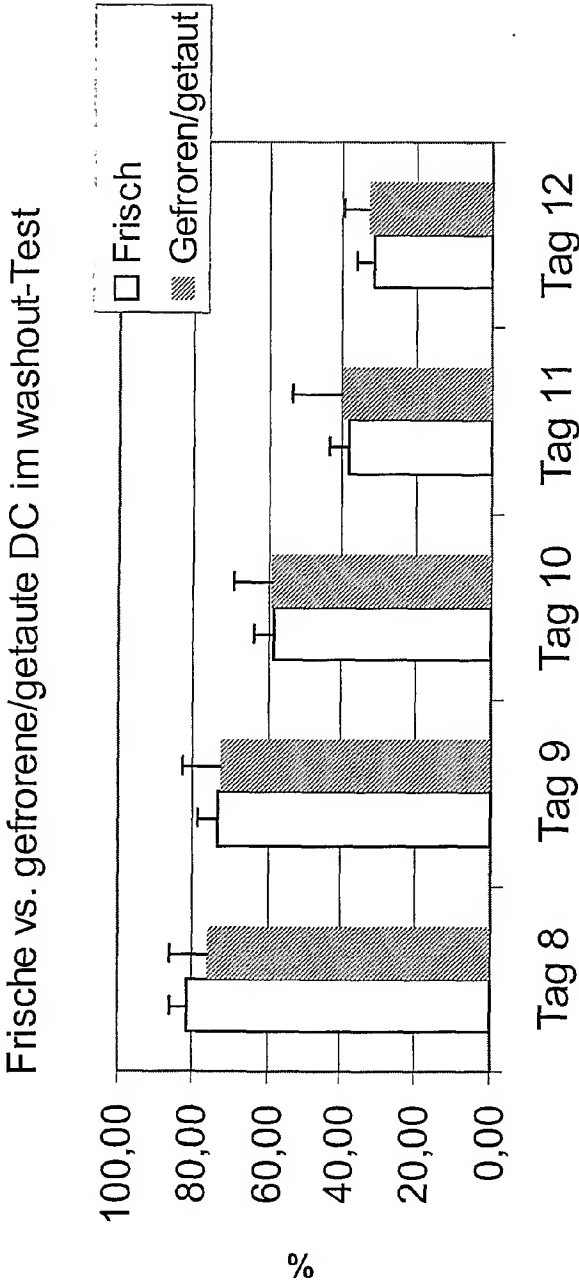
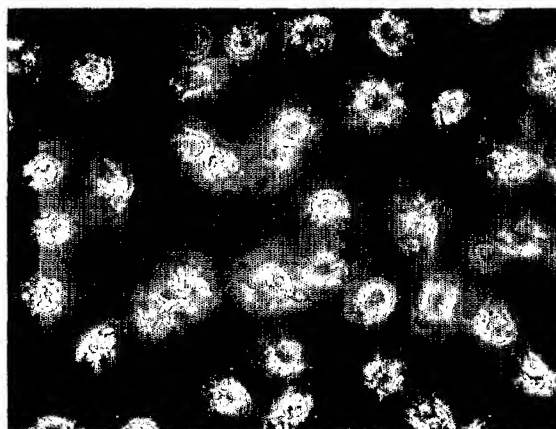
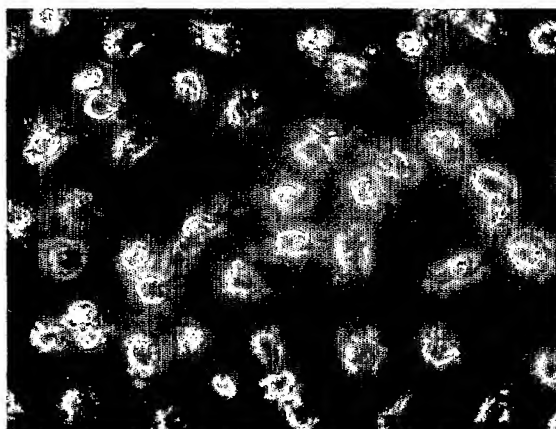


Fig. 4



A



B

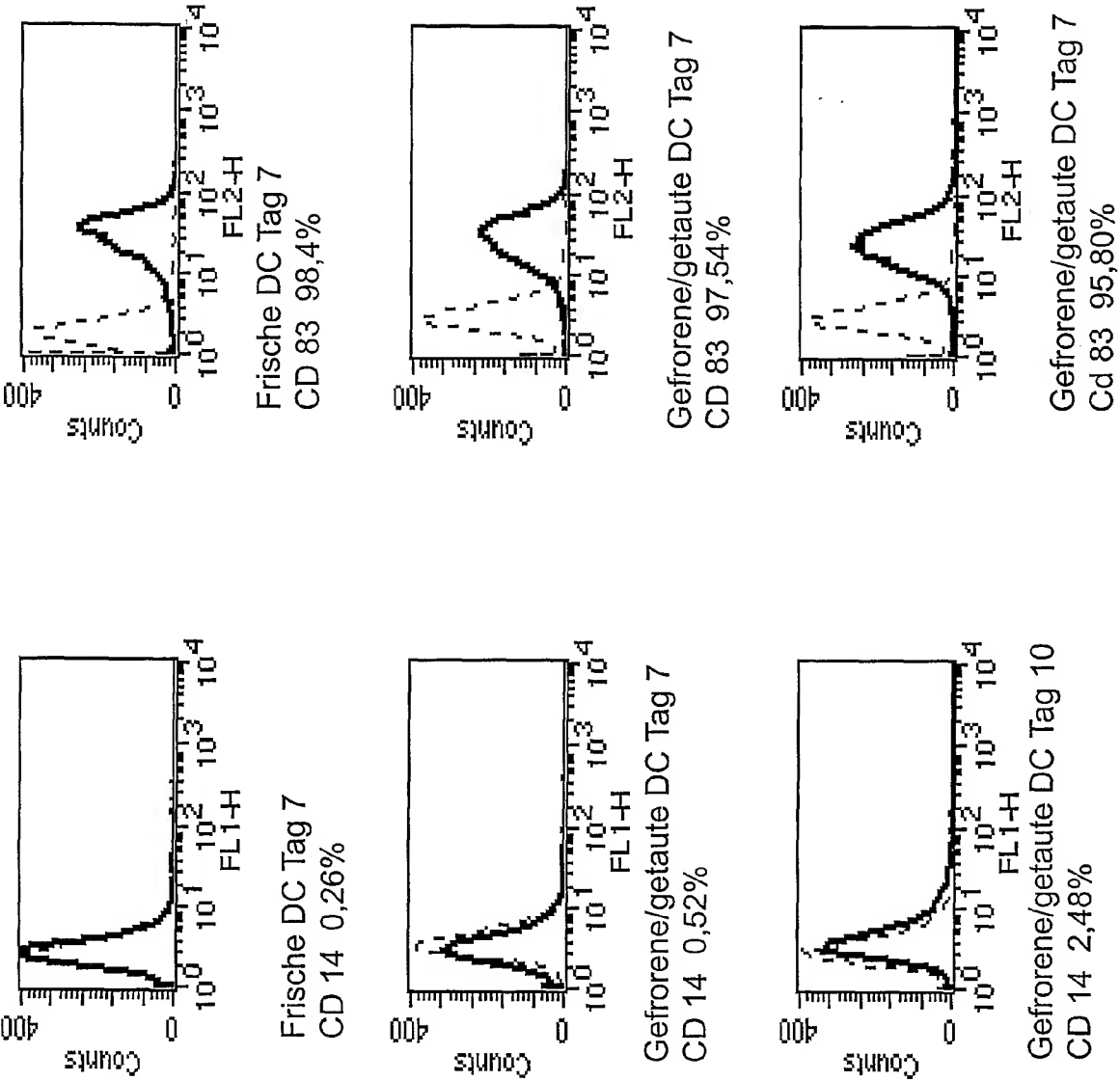


Fig.5

Fig. 6

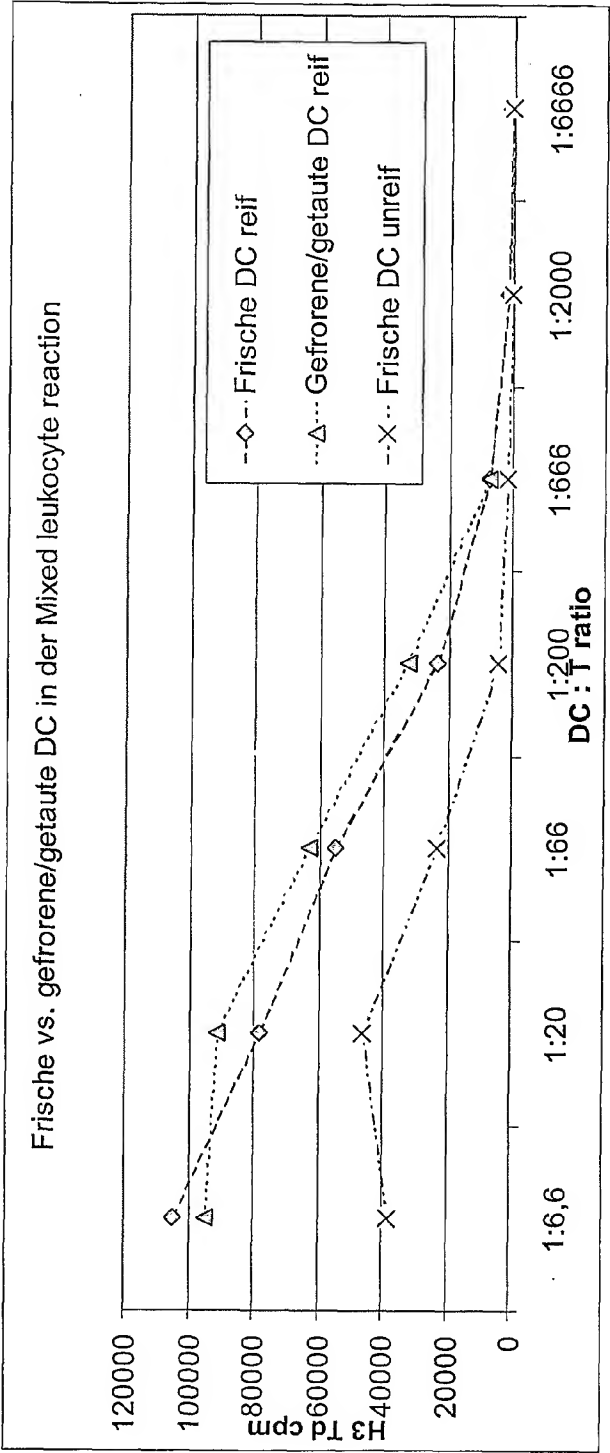


Fig. 7

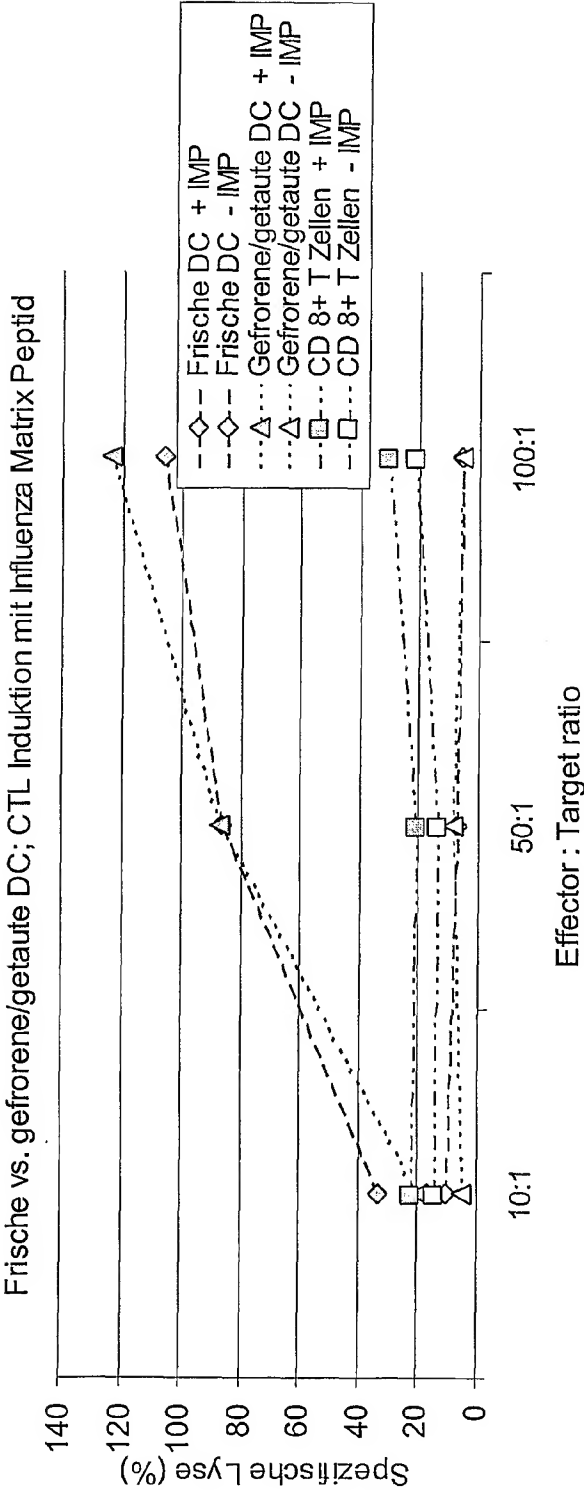


Fig. 8

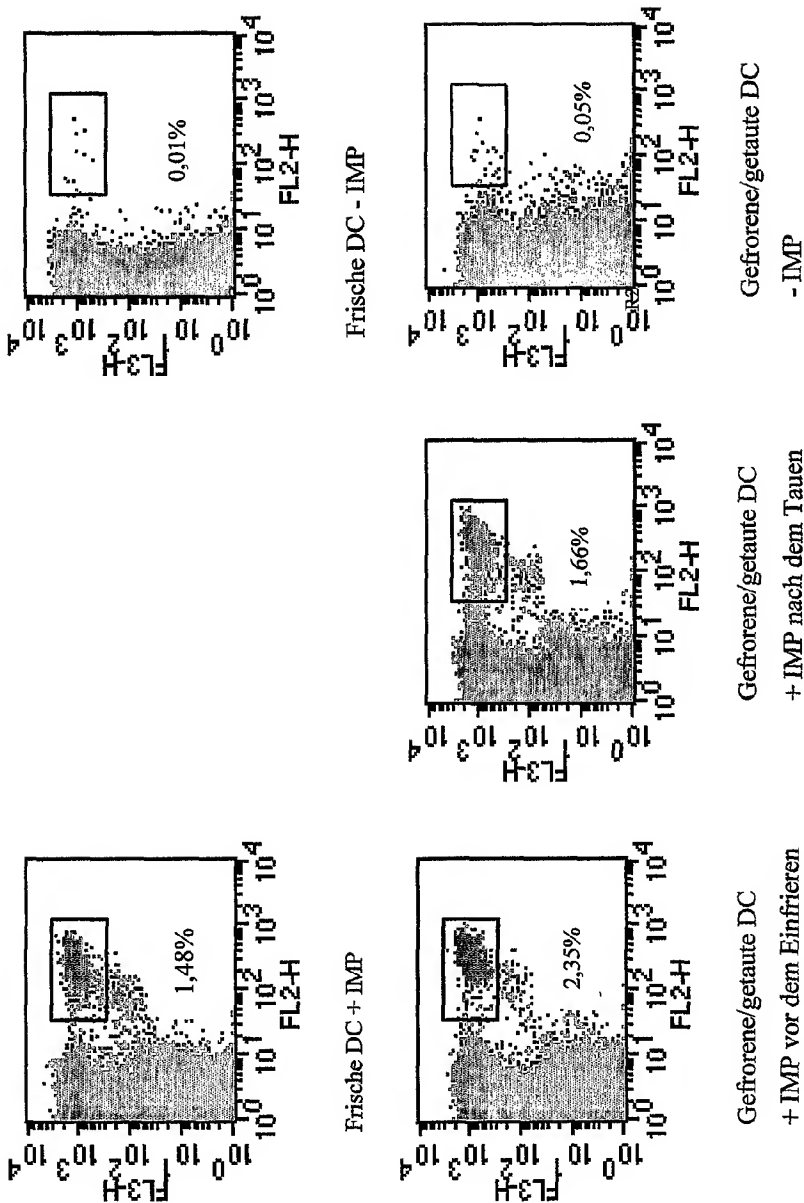
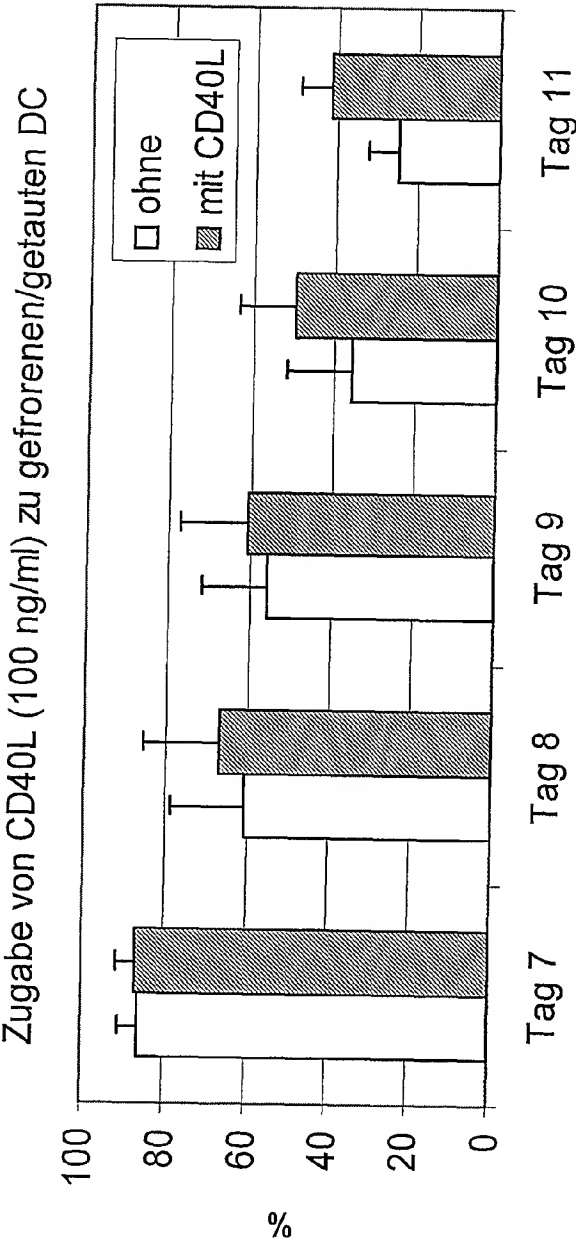




Fig. 9



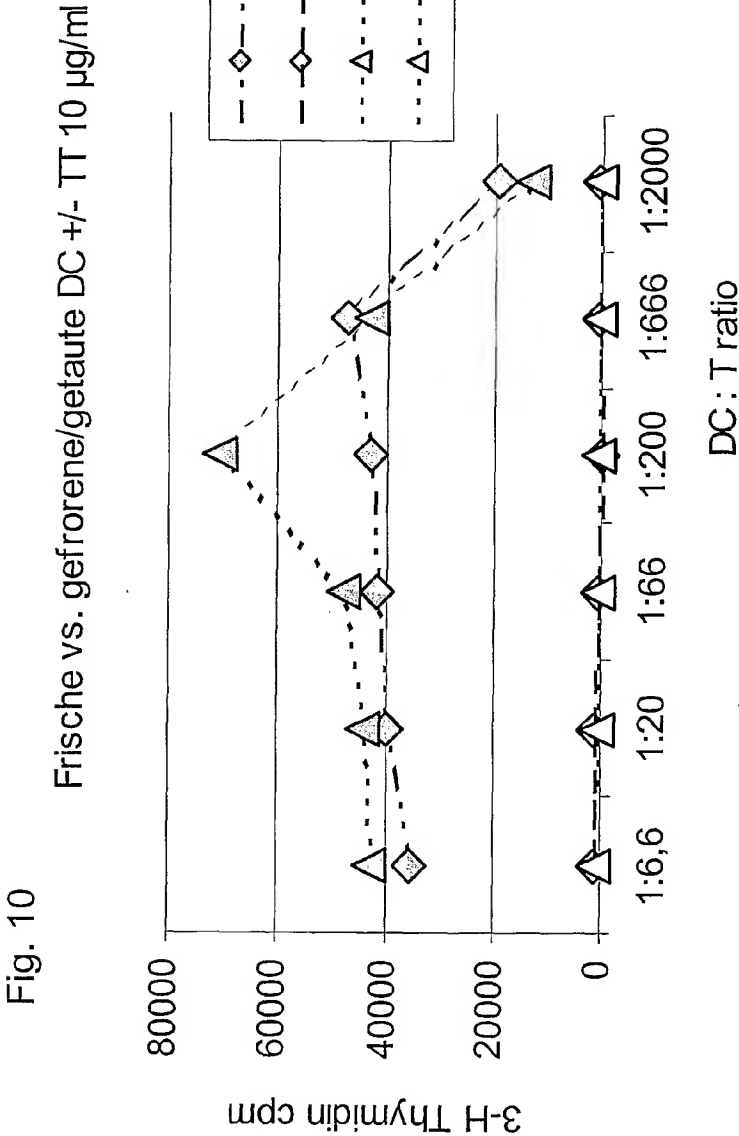


Fig. 11

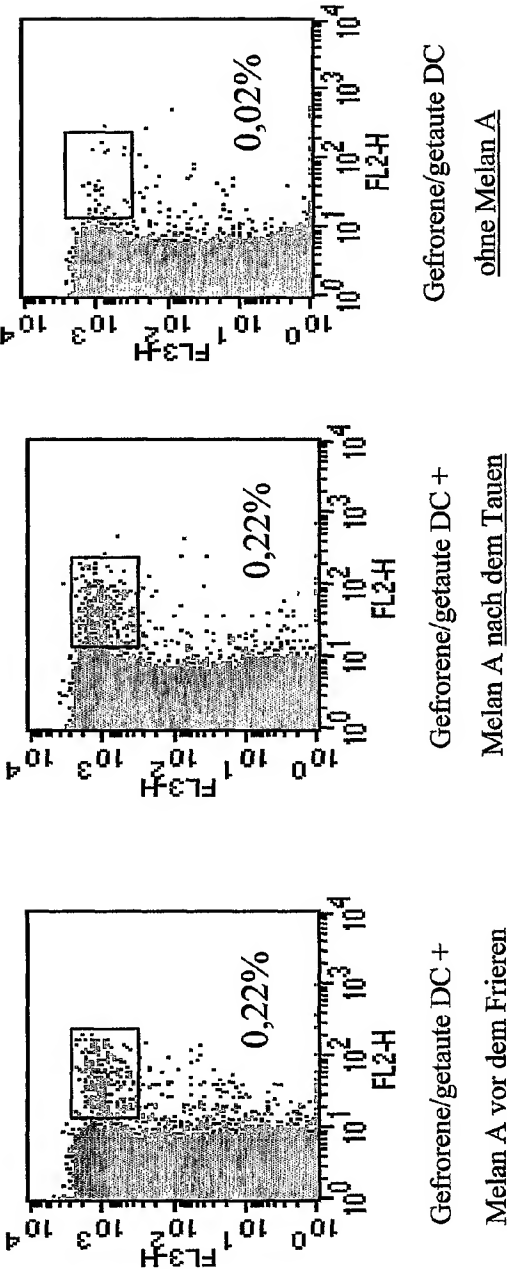


Fig. 12

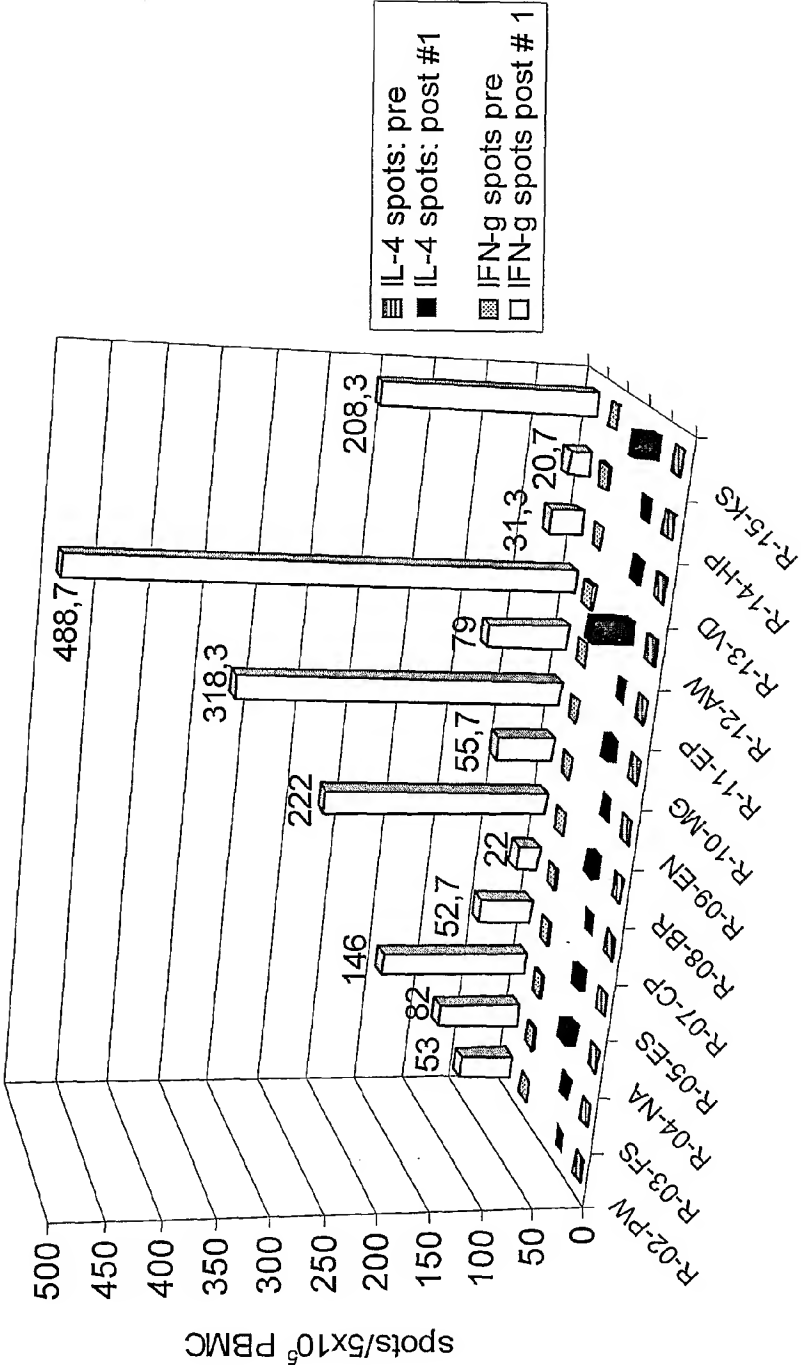


Fig. 13

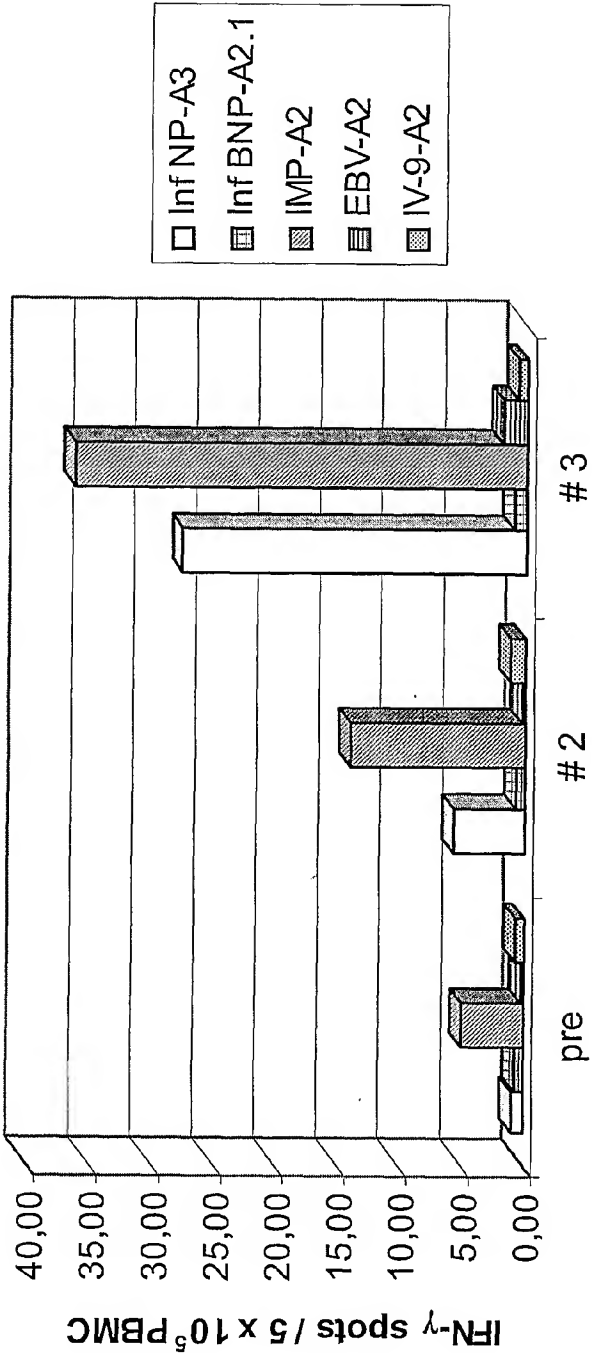


Fig. 14

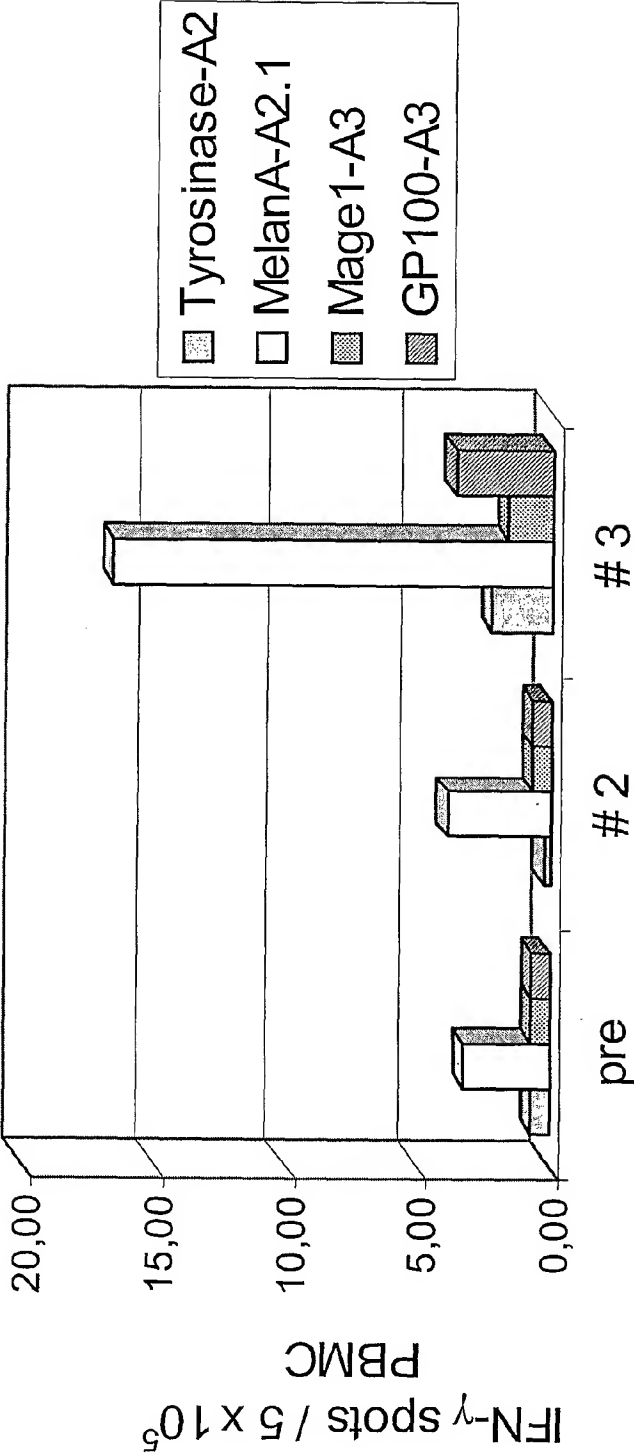
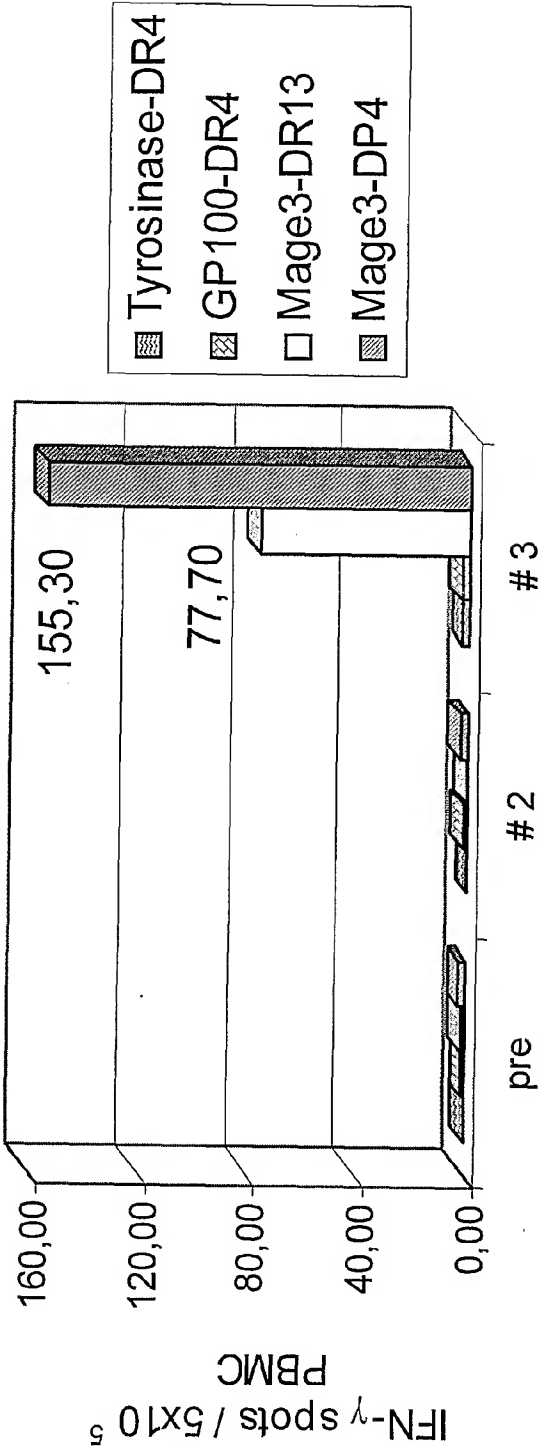


Fig. 15



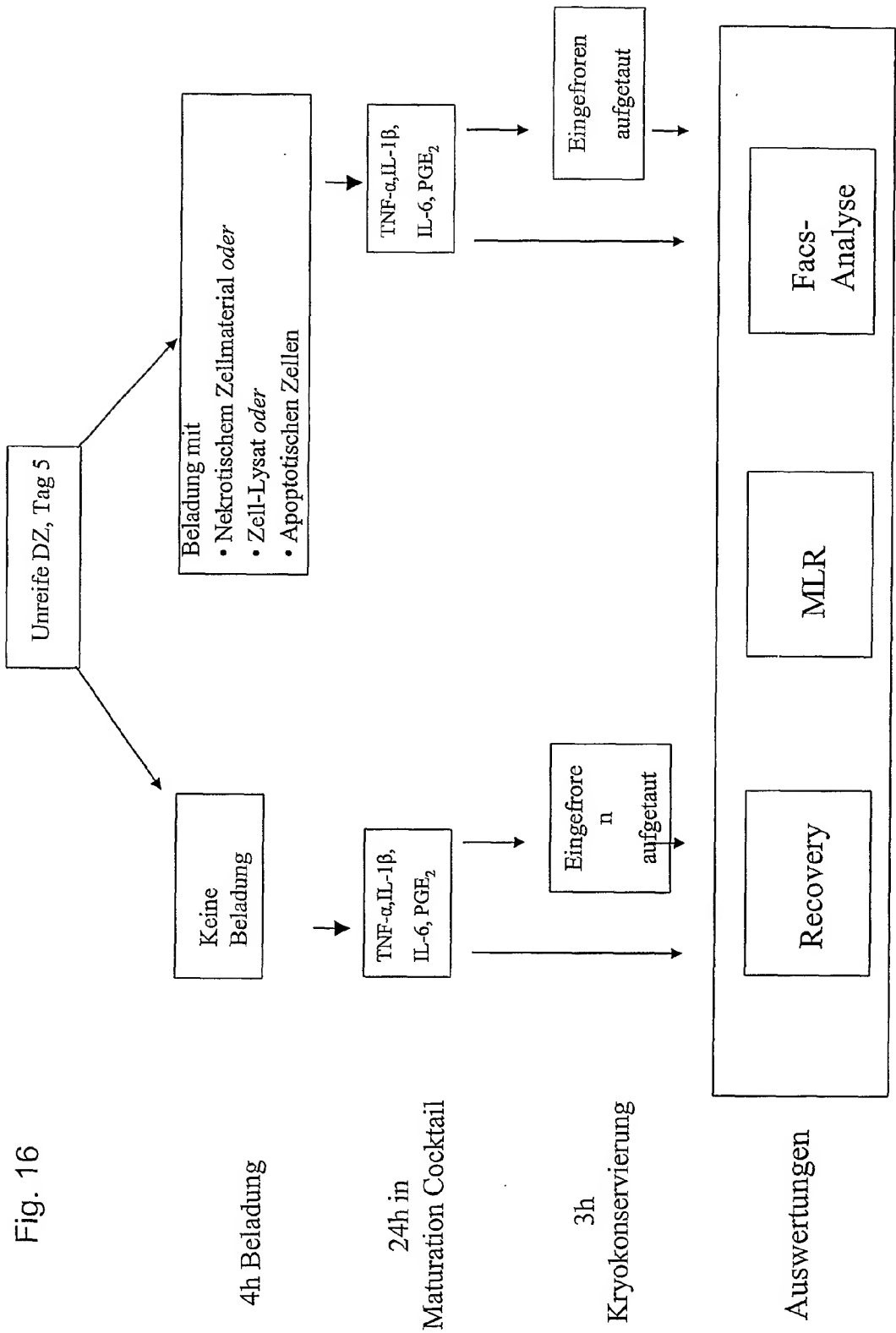


Fig. 16



Fig. 17A

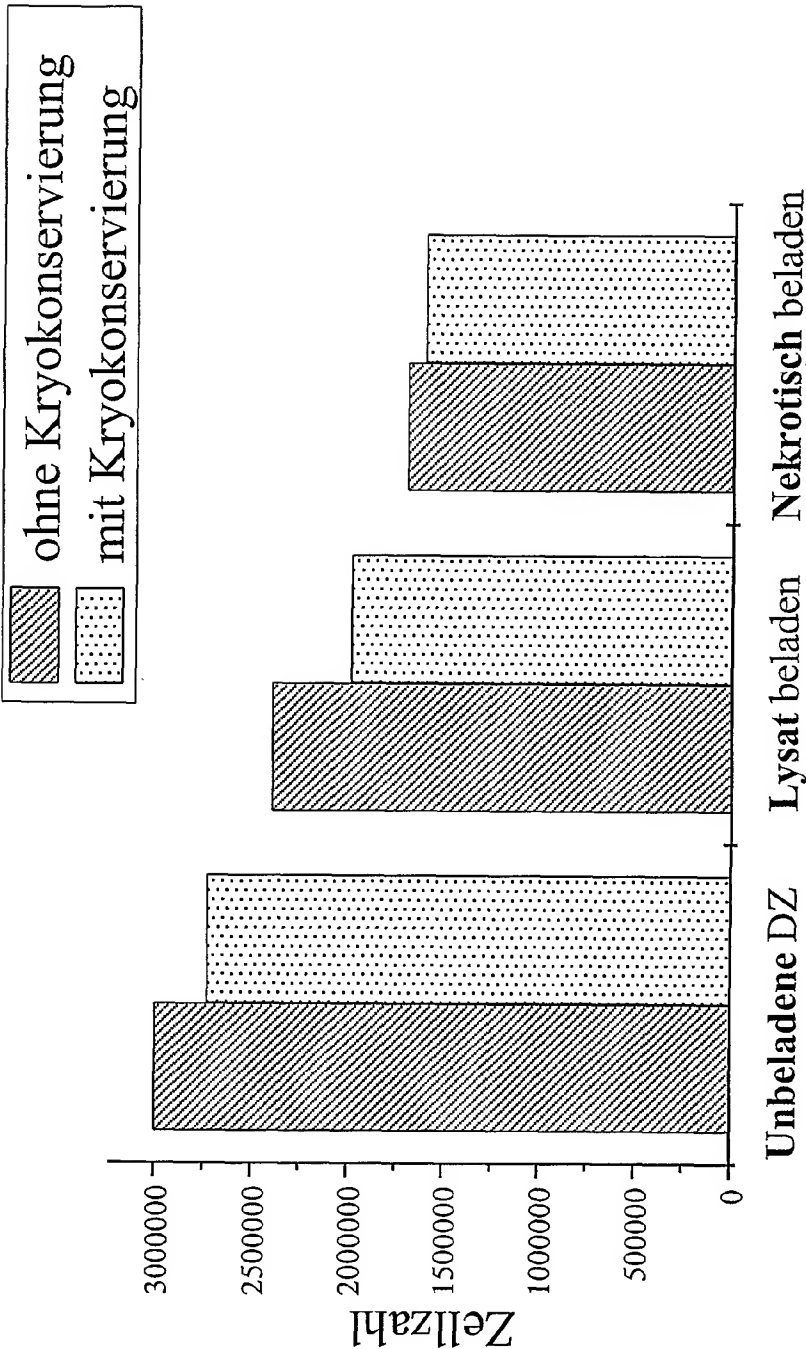


Fig. 17B

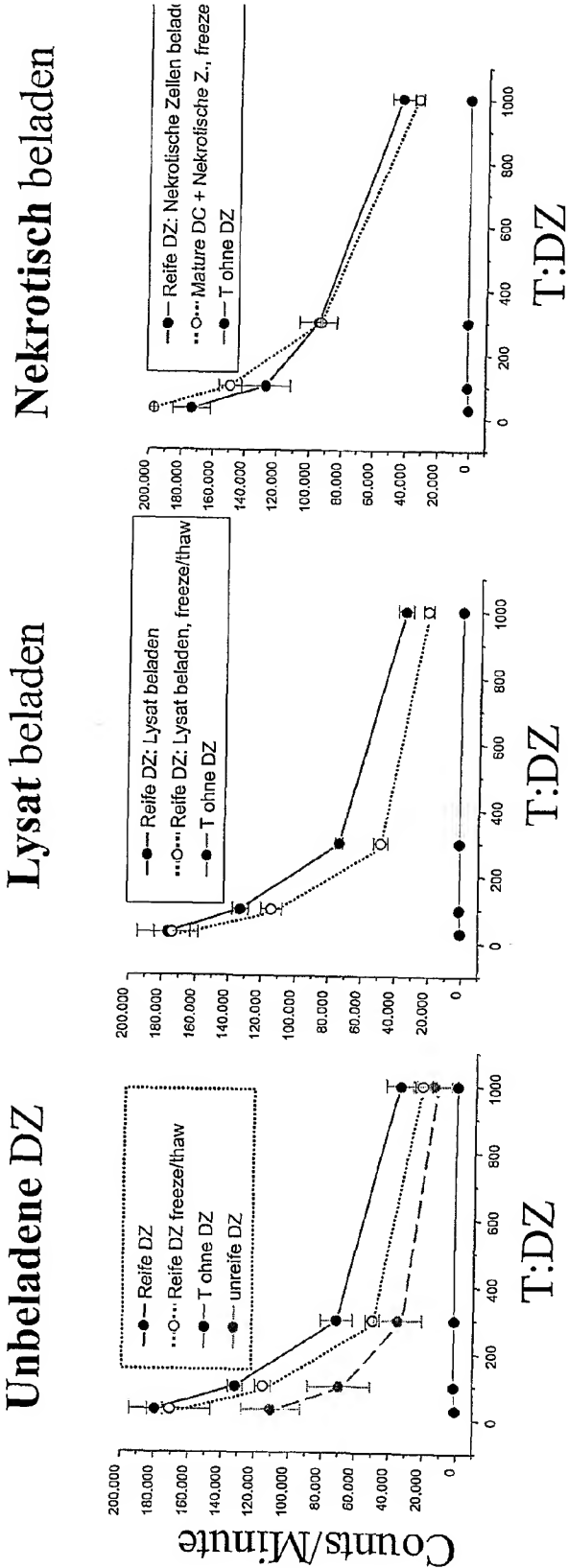
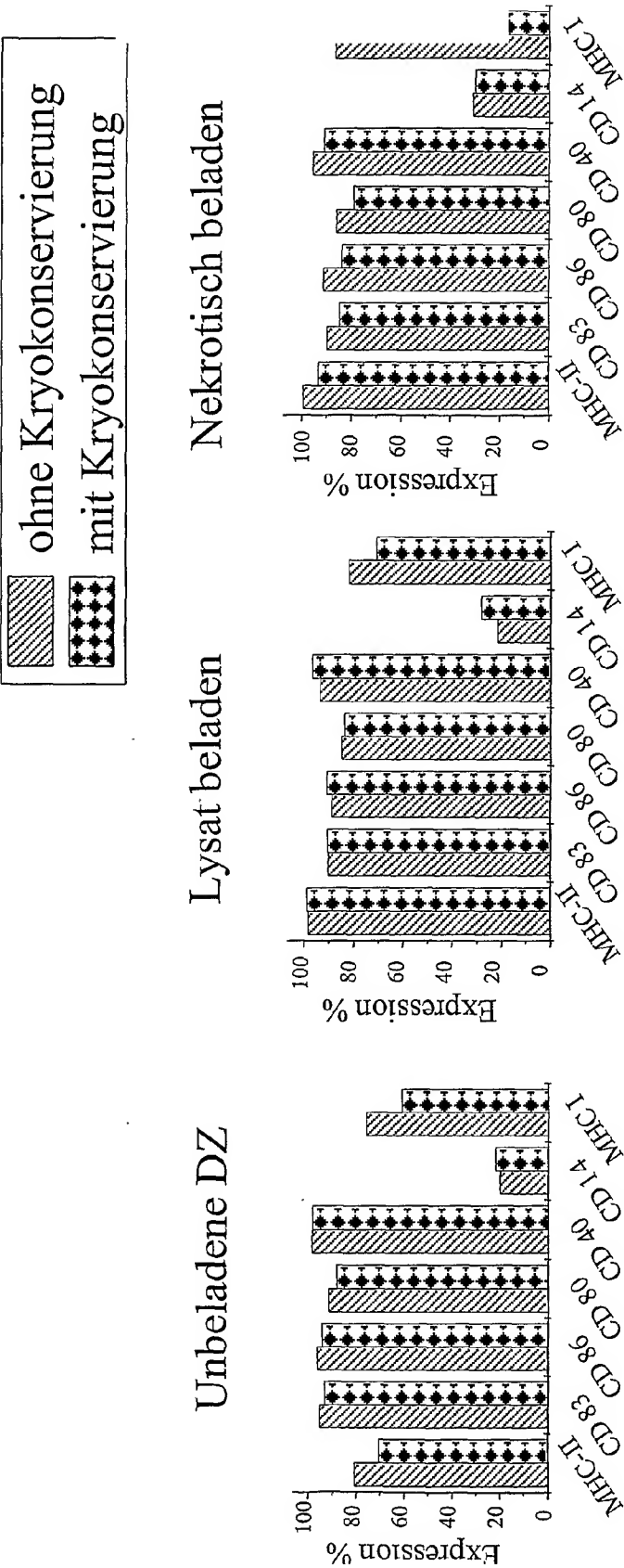


Fig. 17C



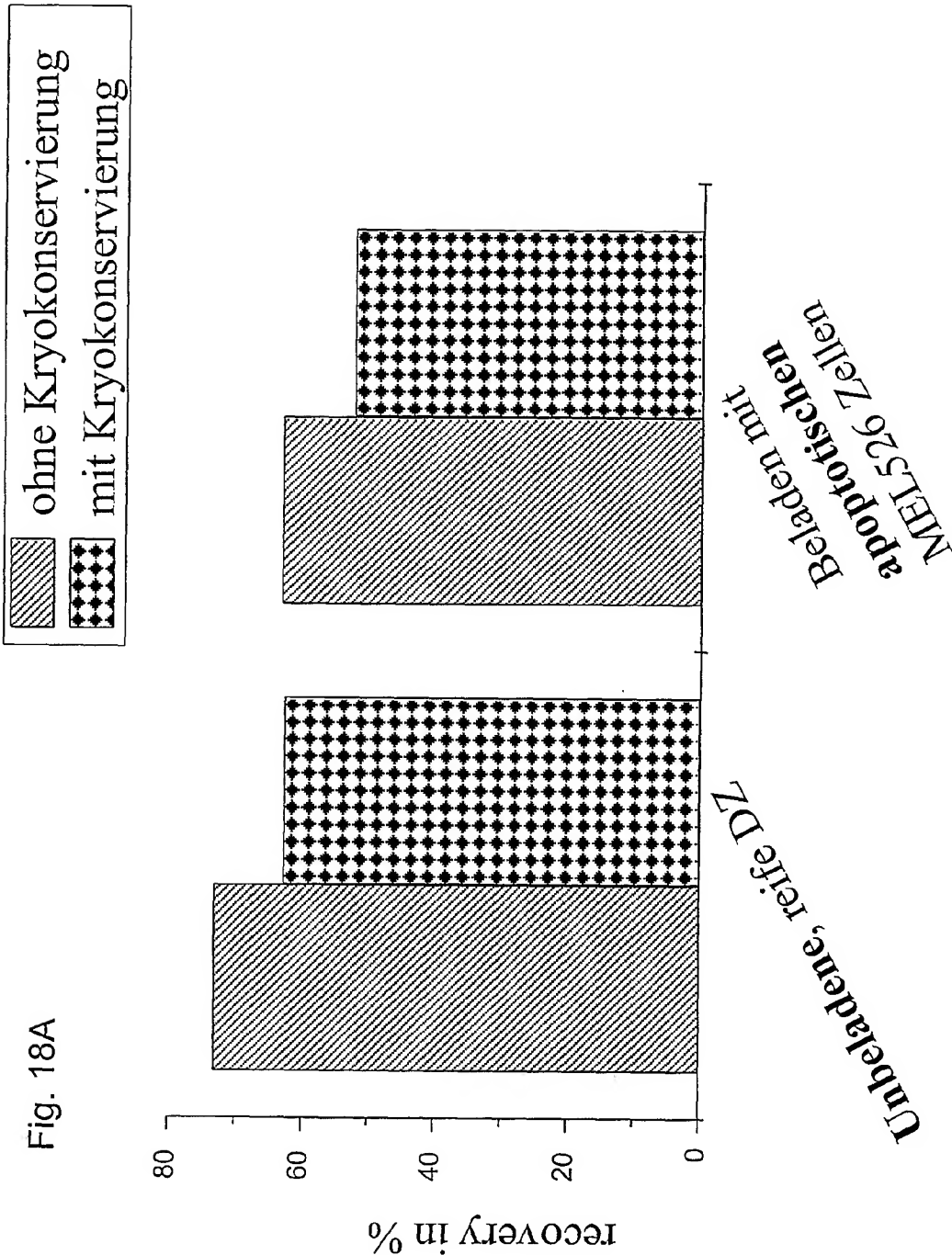


Fig. 18B

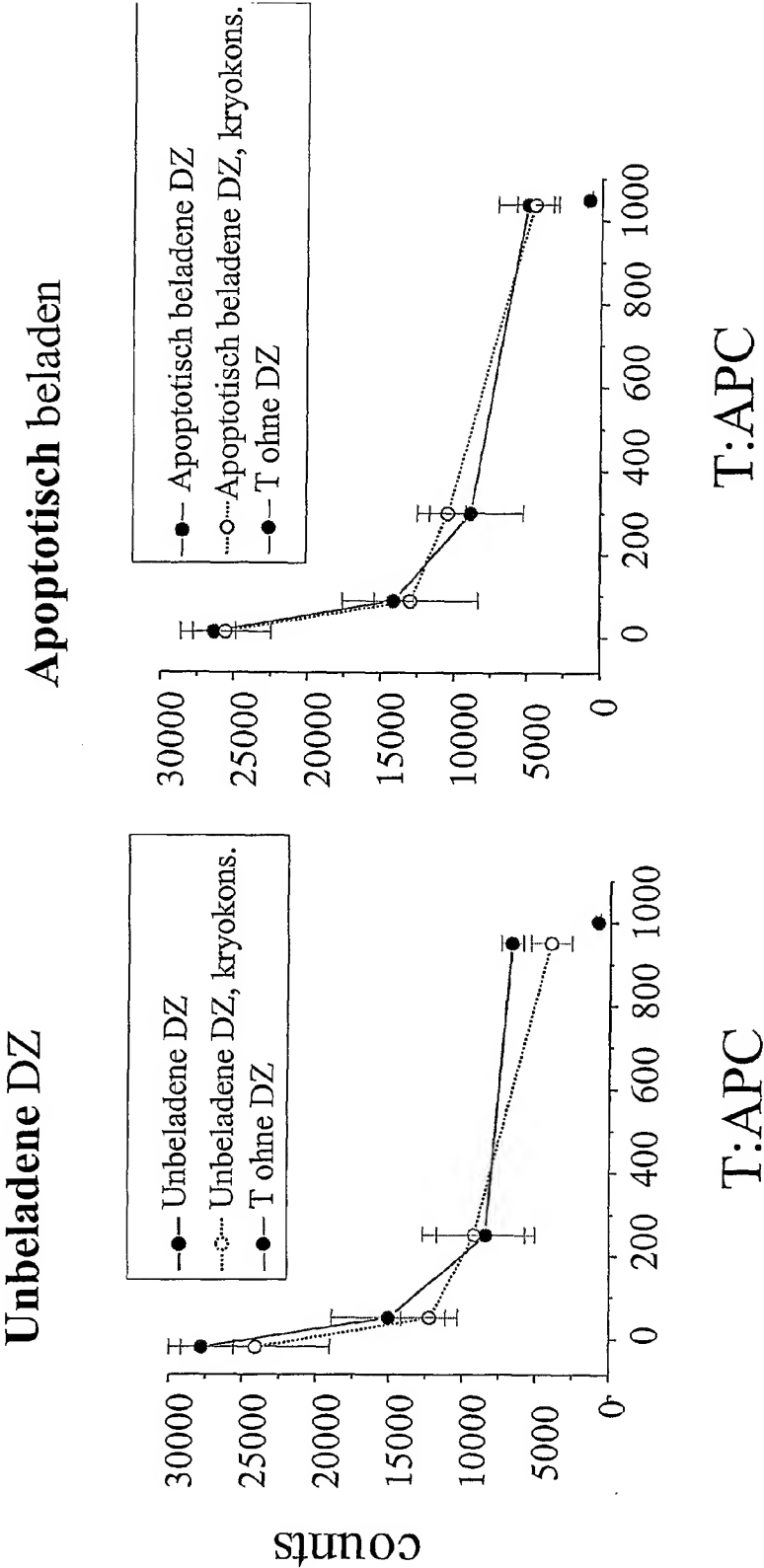


Fig. 18C

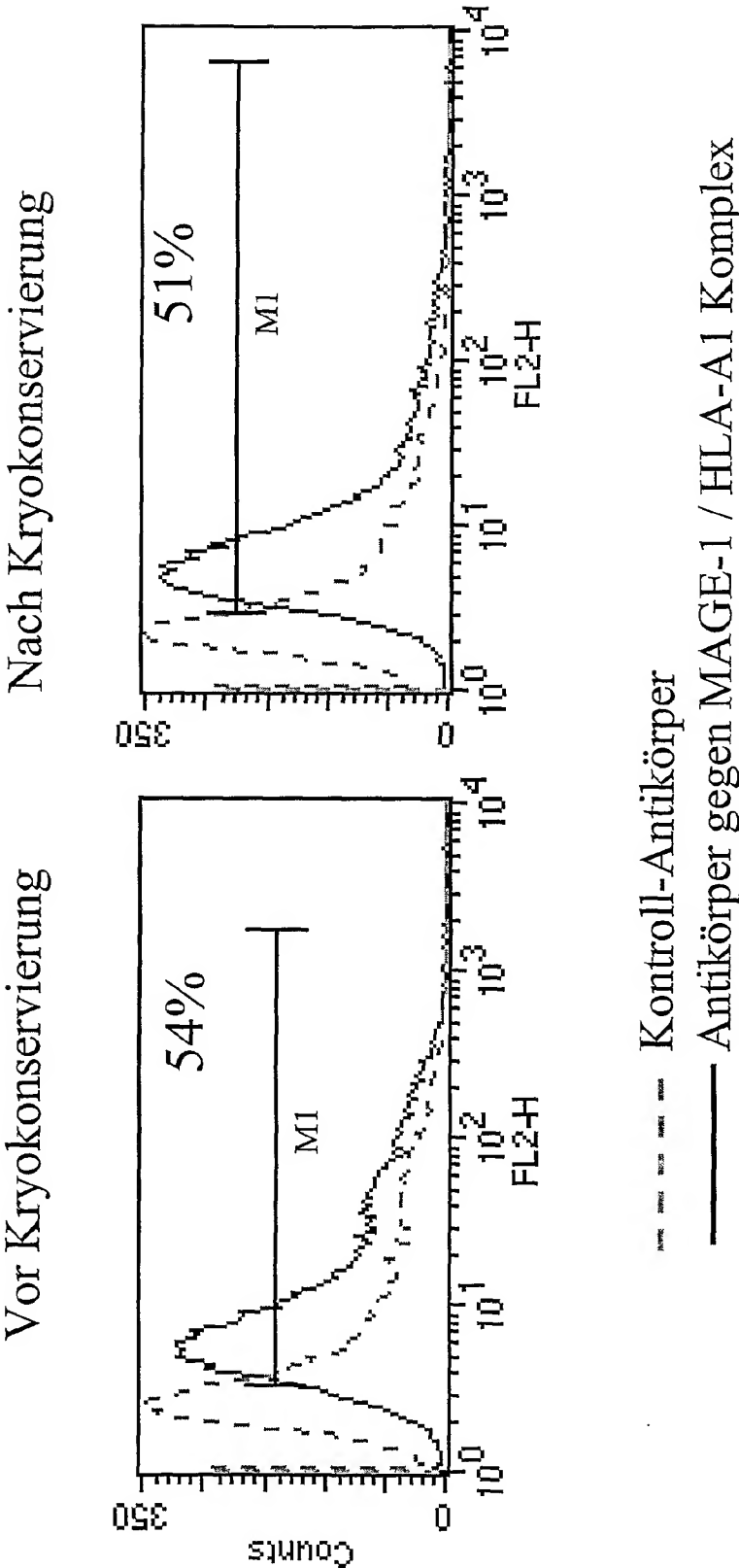


Fig. 18D

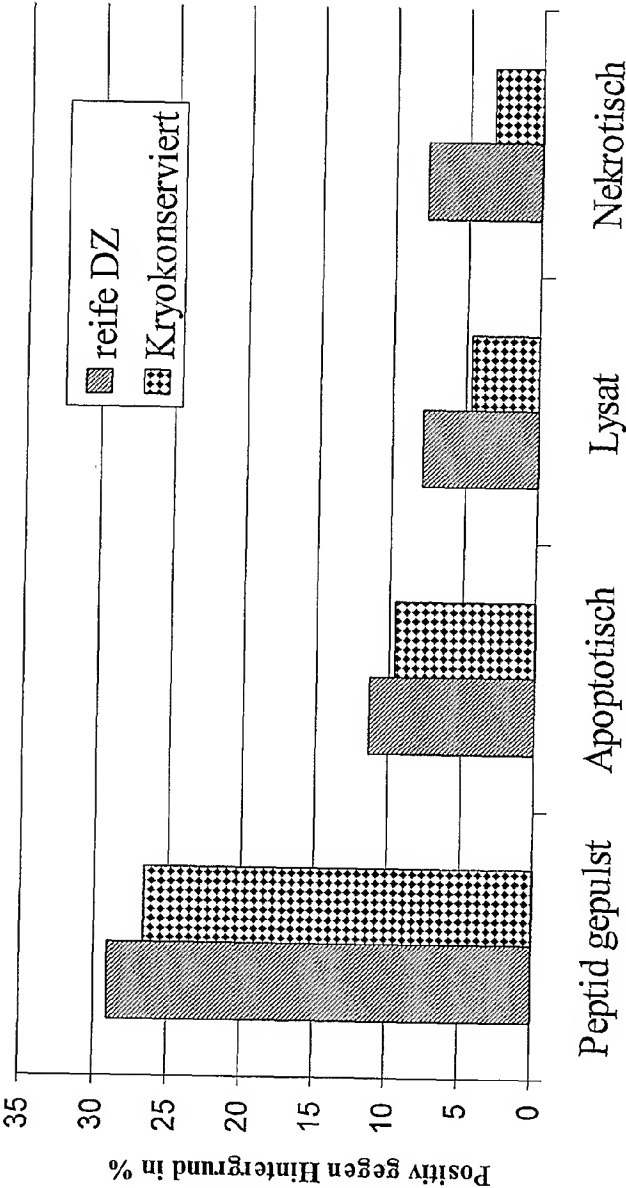


Fig. 19

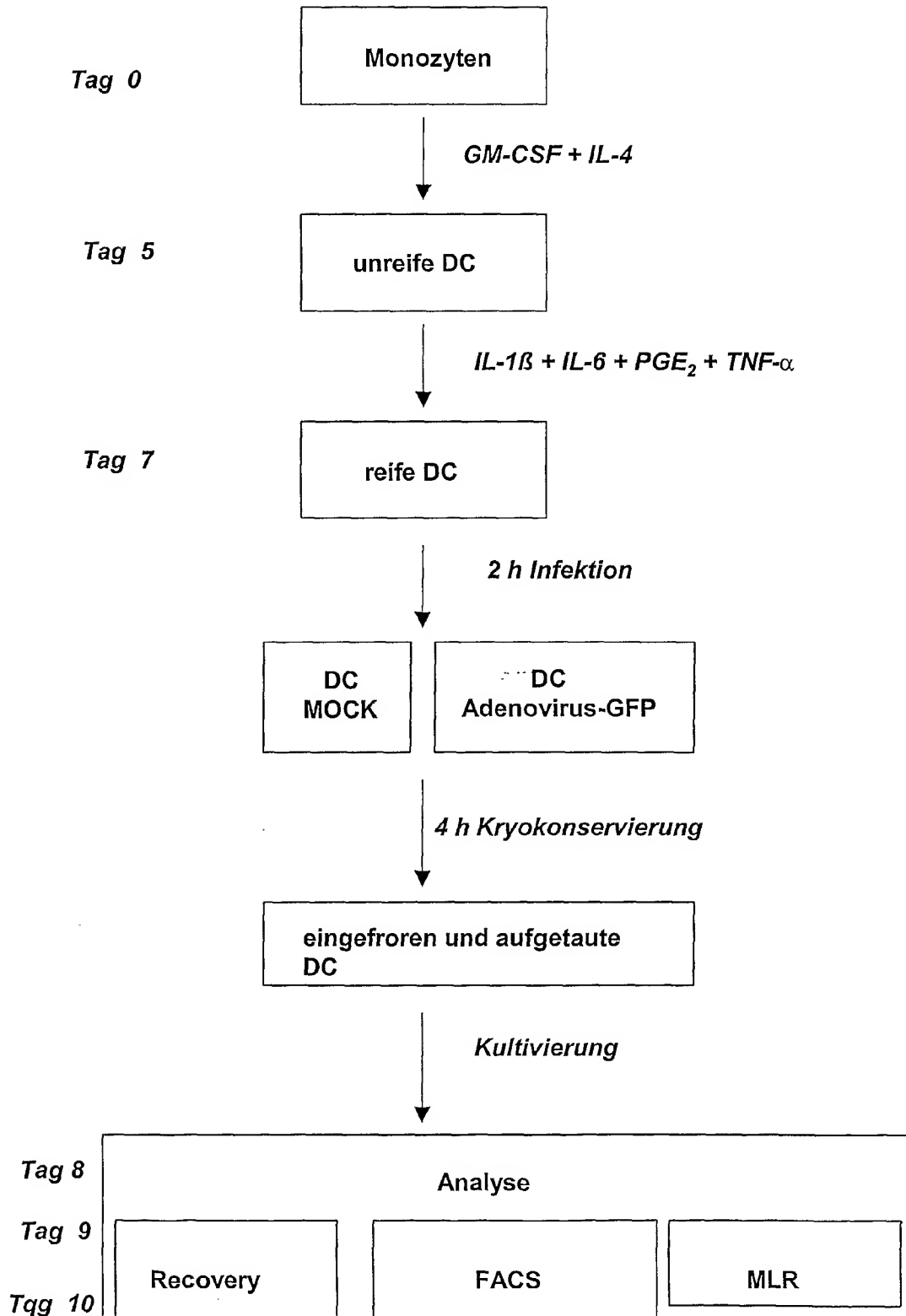




Fig. 20

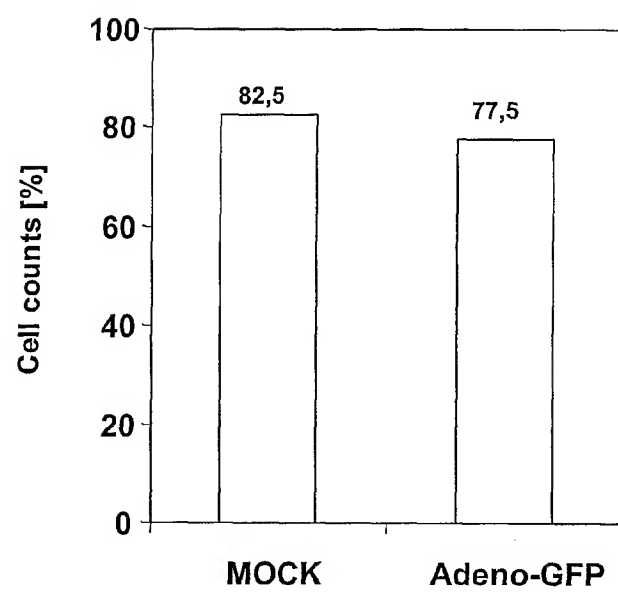
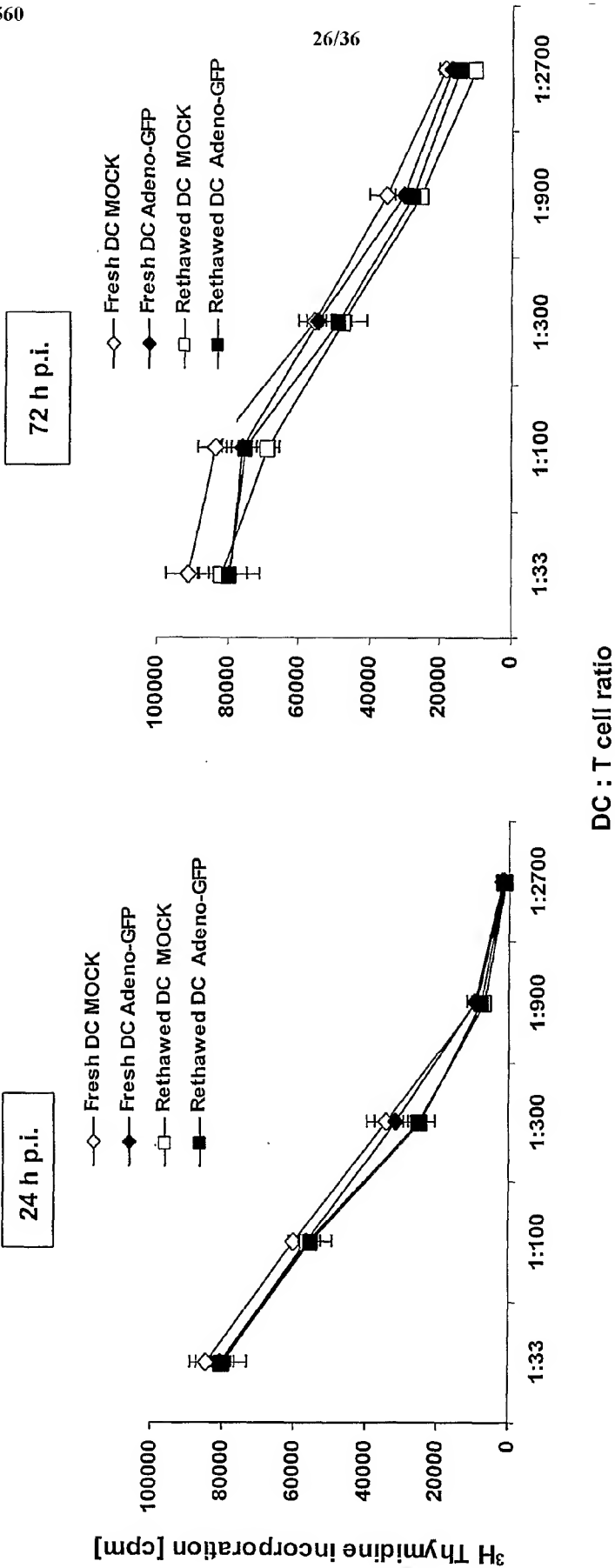


Fig. 21



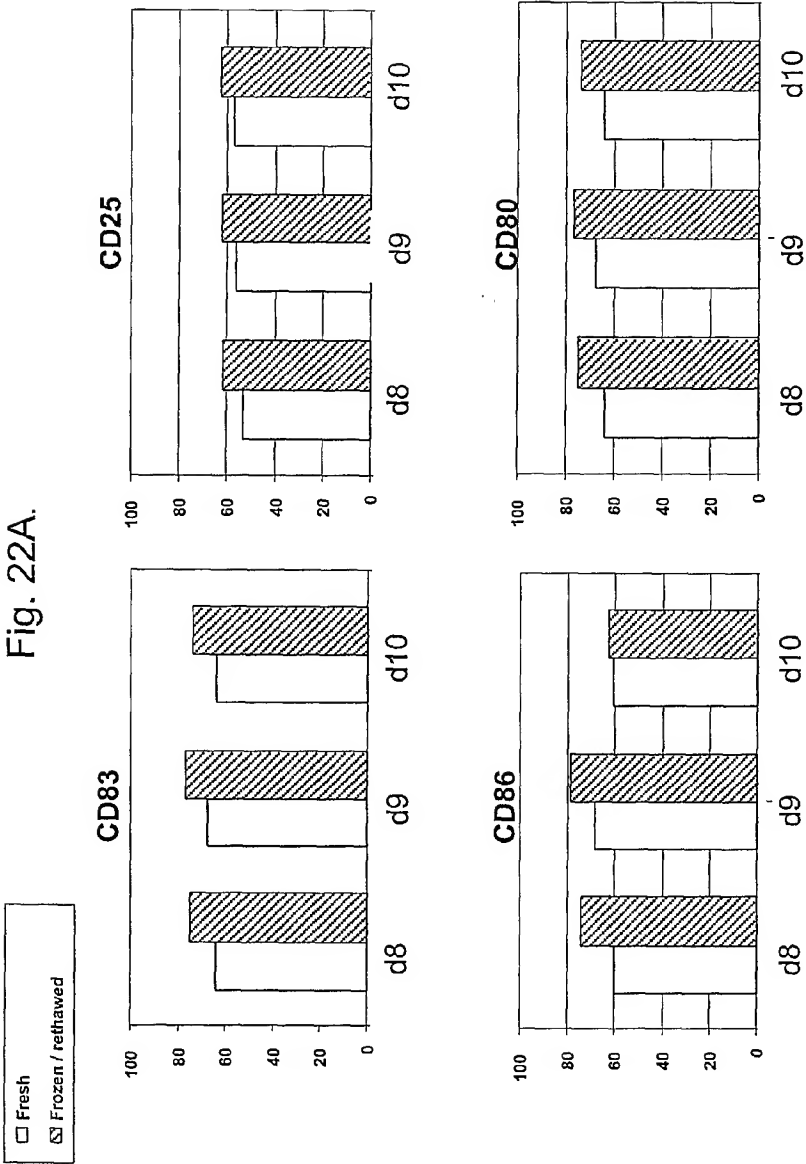


Fig. 22B

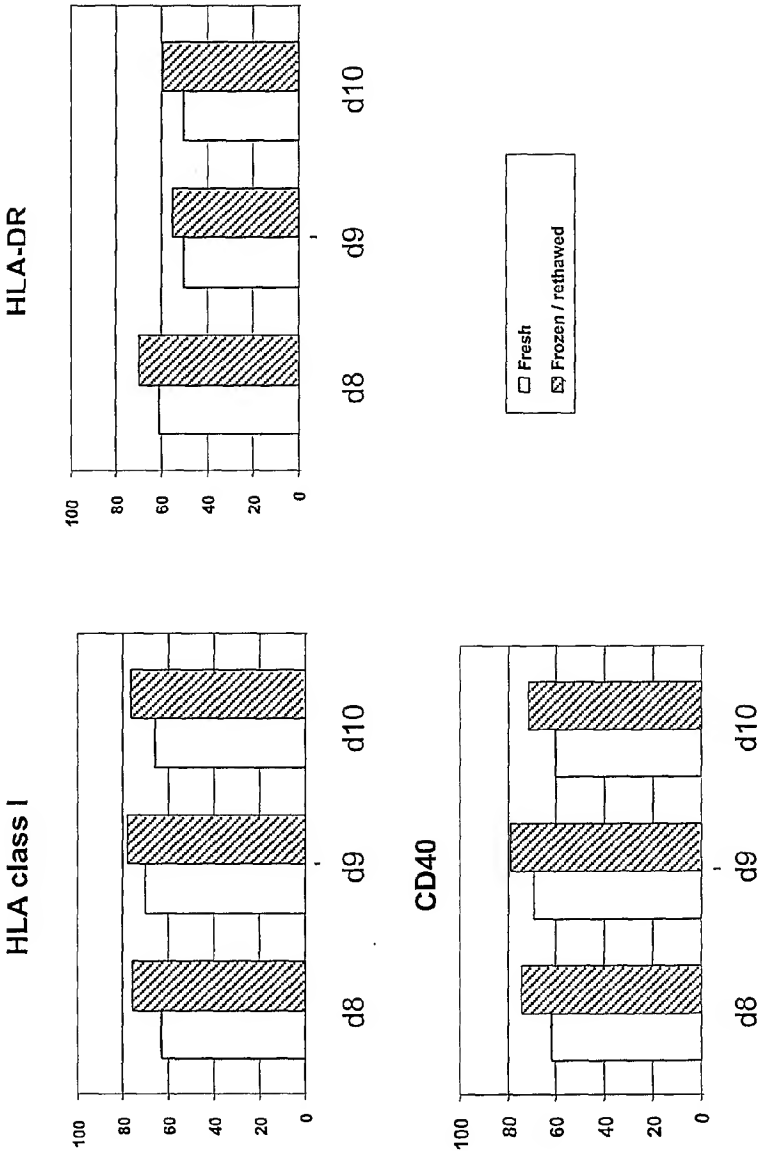


Fig. 23A

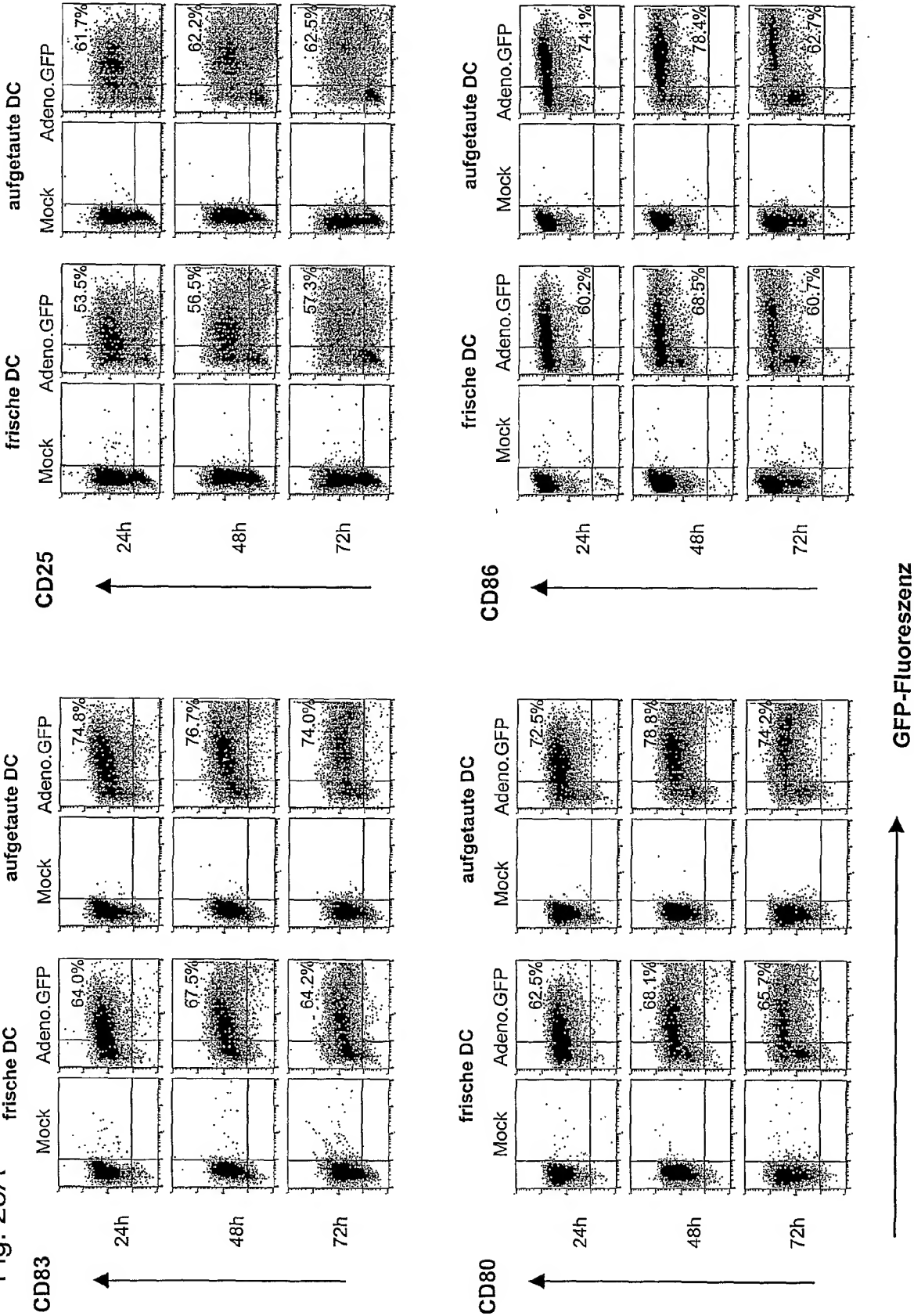


Fig. 23B

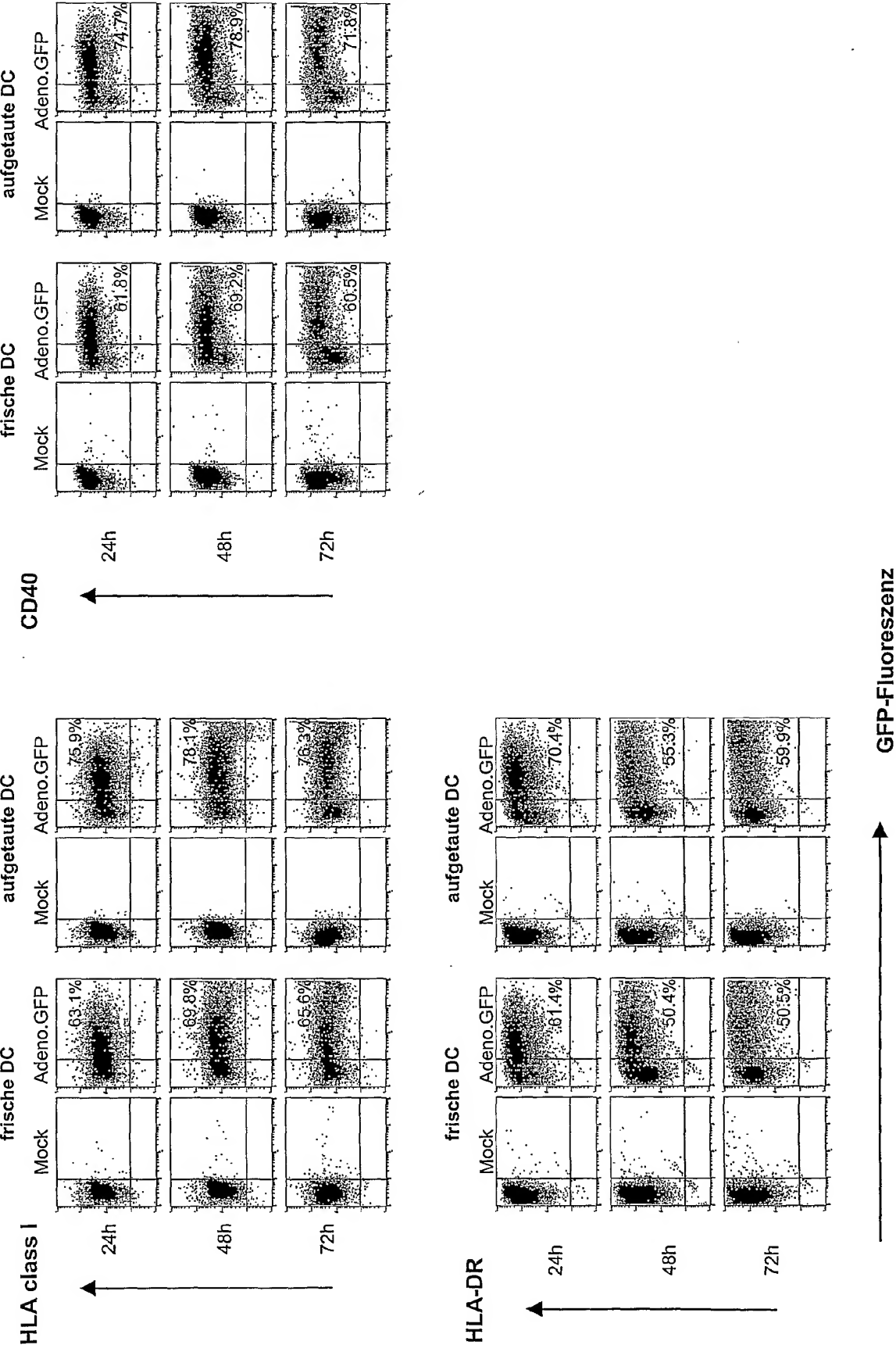


Fig. 24

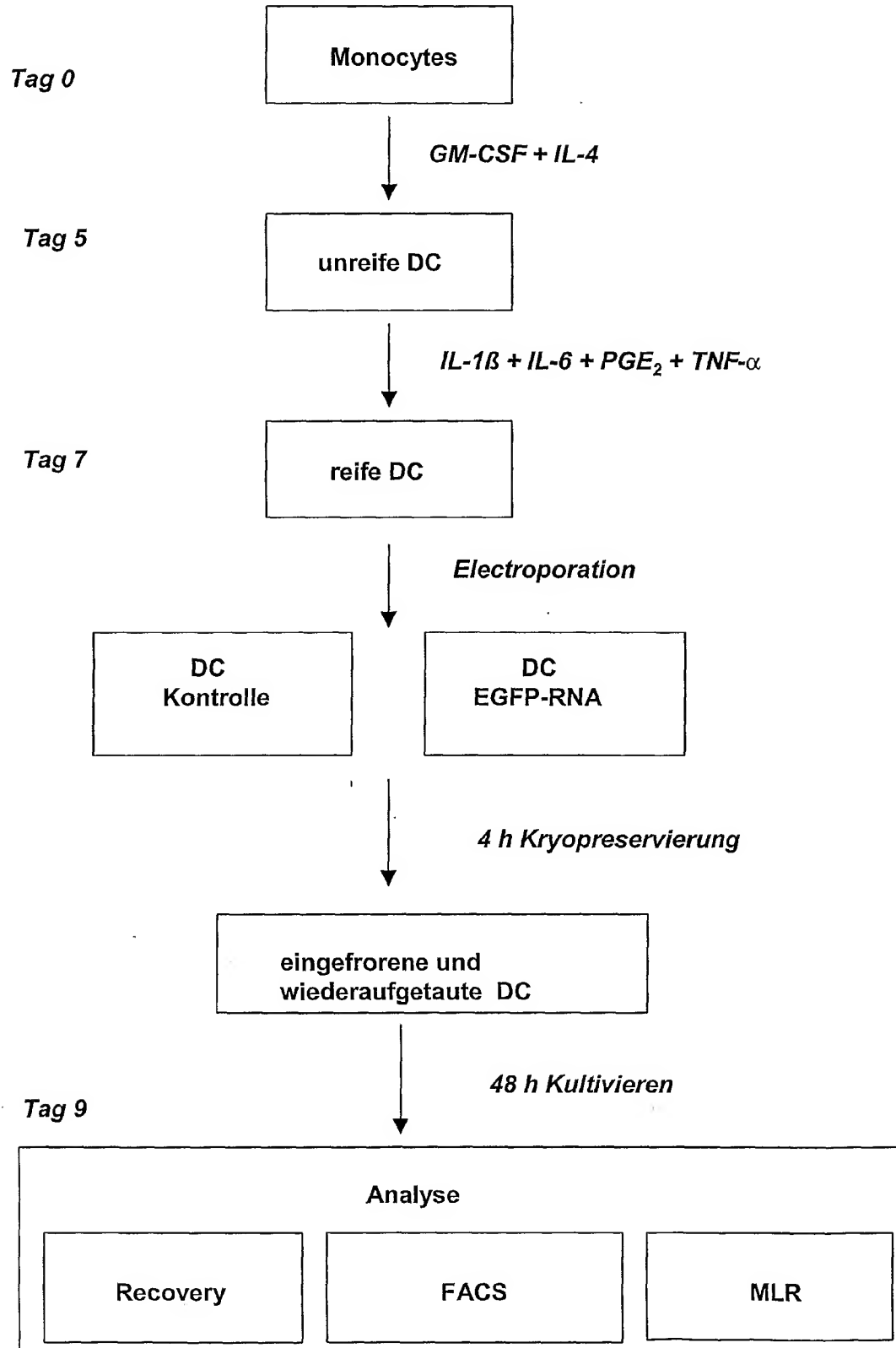


Fig. 25

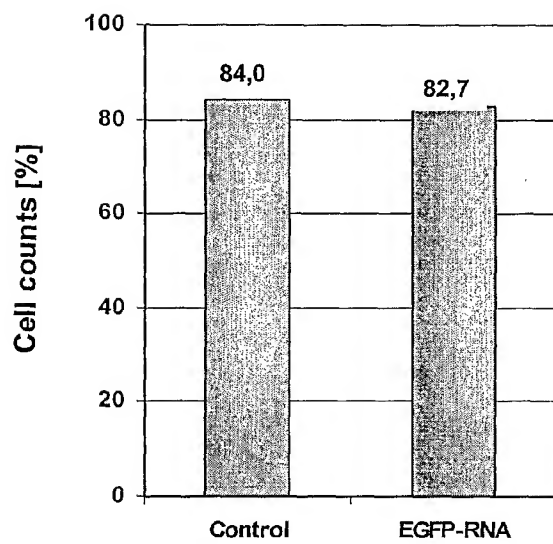
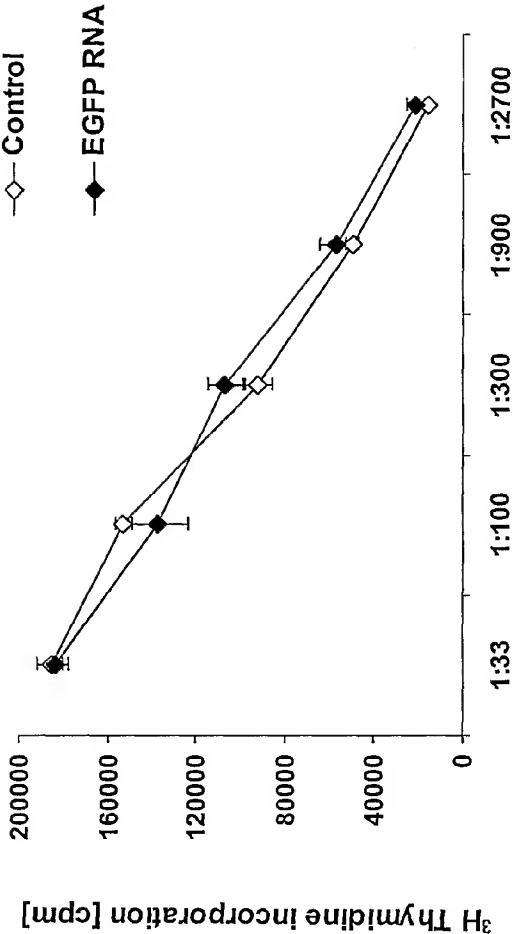




Fig. 26



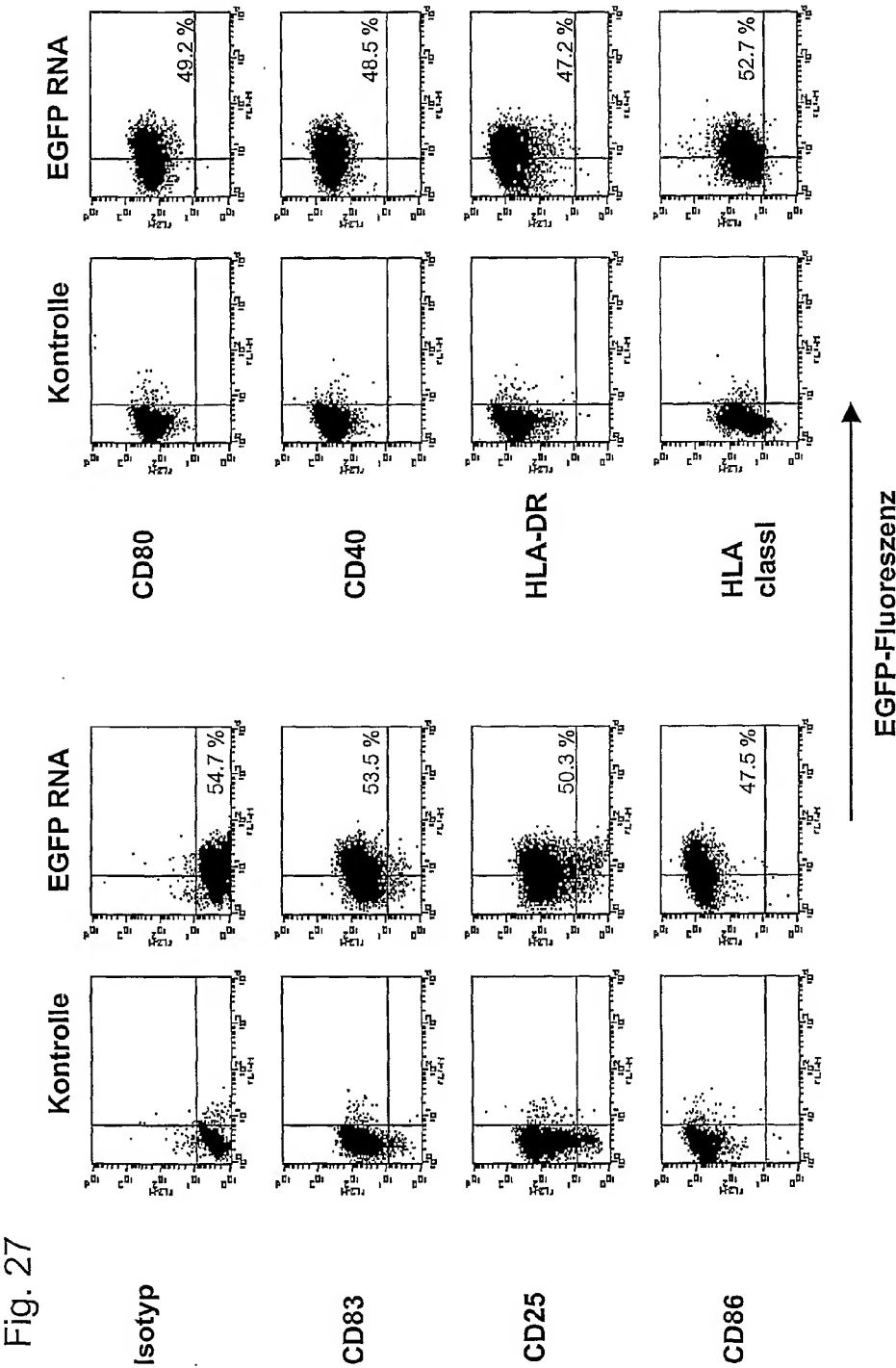


Fig. 28

Peptid-Bezeichnung	HLA-Restriktion A1 (48 %)	Sequenz	SEQ ID NO:	Literaturstelle
Influenza Matrix	A2.1	GILGFVFTL	1	J. Exp. Med. 186: 859 (1997) i
Influenza B NP AS 85-94	A2.1	KLGEFYNQMM	3	Immunogenetics 41: 78 (1995) i
Mage-3A2	A2.1	FLWGPRLV	4	Eur. J. Immunol. 24: 3038 (1994)
Mart 1/Melan A, AS 26-35 ana*	A2.1	ELAGIGILTV	2	J. Immunol. 160: 1750 (1998)
gp 100, AS 209-217 ana*	A2.1	IMDQVPFSV	5	Nature Medicine 3:321 (1998) , J. Immunol. 157:2539 (1996)
Tyrosinase AS 368-376	A2.1	YMDGTMSQV	6	J. Exp. Med. 183 527 (1996)
GnTV Nt 38-64	A2.1	VLPDVFIRCV	7	J. Exp. Med. 183:1173 (1996)
Mage-A10 AS 254-262	A2.1	GLYDGMHL	8	J. Immunol 1.62:-6849 (1999)
Mage-A4 AS 230-239	A2.1	GVVDGREHTV	9	Eur. J. Immunol. 29:3329 (1999)
	<b>A1 (26 %)</b>			
Influenza NP	A1	CTELKLSDY	10	J. Immunol. 151: 5930 (1993)
Influenza PB1 AS 591-599	A1	VSDGGPNLY	11	J. Exp. Med. 186: 859 (1997)
Mage-3A1	A1	EVDPIGHLY	12	J Exp Med. 179.921999
Mage-1	A1	EADPTGHSY	13	3 J . Exp . Med . 17 6:14 5 3 (19 92) ,Int. J. Cancer 67:54(1996)
Tyrosinase AS 243-251 ana*	A1	KSDICTDEY	14	J. Immunol. 160: 2099 (1998)
	<b>A3 (32 %)</b>			
Influenza NP AS 265-273	A3	ILRGSAHAK	15	J. Exp. Med. 186: 859 (1997)
Mage-1 AS 96-104	A3	SLFRAVITK	16	J. Immunol. 163:2928 (1999)
gp100	A3	LIYRRRLMK	17	J. Immunol. 16.1 69.85 (1998)
	<b>A 24 (18 %)</b>			
Tyrosinase	A24	AFLPWHRLF	18-	J.-Immunol. 155:155 (1995) i
Mage-1	A24	NYKHCFPEI	19	Int. J. Cancer 80:169 (1999)
gp 100	A24	VYFFLPDHL	20	J. Immunol 159 303 (1997)
Mage-3	A24	IMPKAGLLI	21	Cancer Res. 57:4465 197
	<b>B44 (13 %)</b>			
Tyrosinase	B44	SEIWRDIDF	22	Eur. J. Immunol. 26:224 (1996)
Mage 3	B44	MEVDPIGHLY	23	Immunogenetics 43 377 (1993)

Fortsetzung Fig. 28

Peptid-Bezeichnung	HLA-Restriktion MHC II	Sequenz	SEQ ID NO:	Literaturstelle
Tyrosinase AS 450-462 ana*	DRB1*0401 <sup>a</sup> [20-25%]	SYLQDSVPDSFQD	24	J. Exp. Med. 183:1965 (1996)
gp 100	DRB1*0401 <sup>b</sup> [20-25%]	WNRQLYPEWTEAQRLD	25	Cancer Immunol. Immunother. 1 47:32 (1998) I
Mage-3 AS 121-134	DRB1*1301 DRB1*1302 [20-25%] <sup>c</sup>	LLKYRAREPVTKAE	26	J. Exp. Med 189:767-778 (1999)
Mage-3 AS 243-258	DPB1*0401 [64%] DPB1*0402 <sup>d</sup> [21%]	KKLLTQHFVQENYLEY	27	Unveröffentlicht, T. Boon, persönliche Mitteilung

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Schuler, Gerold

5 <120> Verfahren zur Herstellung gebrauchsfertiger,  
antigenbeladener oder -unbeladener, kryokonservierter,  
reifer dendritischer Zellen

10 <130> 010589wo/JH/ml

<140>  
<141>

15 <160> 27

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1  
<211> 9

20 <212> PRT  
<213> Influenza virus

<400> 1  
Gly Ile Leu Gly Phe Val Phe Thr Leu  
25 1 5

<210> 2  
<211> 10

30 <212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

<220>  
<223> Mart1/MelanA-analoges Peptid (AS 26-35)

35 <400> 2  
Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val  
1 5 10

40 <210> 3  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Influenza virus

45 <400> 3  
Lys Leu Gly Glu Phe Tyr Asn Gln Met Met  
1 5 10

50 <210> 4  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

55 <400> 4  
Phe Leu Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val  
1 5

60 <210> 5  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz

65 <220>

<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:gp100-analoges Peptid, AS 209-217

<400> 5  
5 Ile Met Asp Gln Val Pro Phe Ser Val  
1 5

<210> 6  
10 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 6  
15 Tyr Met Asp Gly Thr Met Ser Gln Val  
1 5

<210> 7  
20 <211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 7  
25 Val Leu Pro Asp Val Phe Ile Arg Cys Val  
1 5 10

<210> 8  
30 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 8  
35 Gly Leu Tyr Asp Gly Met Glu His Leu  
1 5

<210> 9  
40 <211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 9  
45 Gly Val Tyr Asp Gly Arg Glu His Thr Val  
1 5 10

<210> 10  
50 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Influenza virus

<400> 10  
55 Cys Thr Glu Leu Lys Leu Ser Asp Tyr  
1 5

<210> 11  
60 <211> 9  
<212> PRT  
<213> Influenza virus

<400> 11  
65 Val Ser Asp Gly Gly Pro Asn Leu Tyr  
1 5

5 <210> 12  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 12  
10 Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr  
1 5  
  
<210> 13  
<211> 9  
15 <212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 13  
20 Glu Ala Asp Pro Thr Gly His Ser Tyr  
1 5  
  
<210> 14  
<211> 9  
25 <212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
  
<220>  
<223> Beschreibung der künstlichen  
30 Sequenz:Tyrosinase-analoges Peptid, AS 243-251  
  
<400> 14  
Lys Ser Asp Ile Cys Thr Asp Glu Tyr  
1 5  
35  
  
<210> 15  
<211> 9  
<212> PRT  
40 <213> Influenza virus  
  
<400> 15  
Ile Leu Arg Gly Ser Val Ala His Lys  
1 5  
45  
  
<210> 16  
<211> 9  
<212> PRT  
50 <213> Homo sapiens  
  
<400> 16  
Ser Leu Phe Arg Ala Val Ile Thr Lys  
1 5  
55  
  
<210> 17  
<211> 9  
<212> PRT  
60 <213> Homo sapiens  
  
<400> 17  
Leu Ile Tyr Arg Arg Arg Leu Met Lys  
1 5  
65

<210> 18  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
5  
<400> 18  
Ala Phe Leu Pro Trp His Arg Leu Phe  
1 5  
10  
<210> 19  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
15  
<400> 19  
Asn Tyr Lys His Cys Phe Pro Glu Ile  
1 5  
20  
<210> 20  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
25  
<400> 20  
Val Tyr Phe Phe Leu Pro Asp His Leu  
1 5  
30  
<210> 21  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
35  
<400> 21  
Ile Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile  
1 5  
40  
<210> 22  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
45  
<400> 22  
Ser Glu Ile Trp Arg Asp Ile Asp Phe  
1 5  
50  
<210> 23  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
55  
<400> 23  
Met Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr  
1 5 10  
60  
<210> 24  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> Künstliche Sequenz  
65  
<220>



<223> Beschreibung der künstlichen  
Sequenz:Tyrosinase-analoges Peptid, AS 450-462

<400> 24

5 Ser Tyr Leu Gln Asp Ser Val Pro Asp Ser Phe Gln Asp  
1 5 10

<210> 25

10 <211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

15 Trp Asn Arg Gln Leu Tyr Pro Glu Trp Thr Glu Ala Gln Arg Leu Asp  
1 5 10 15

<210> 26

20 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

25 Leu Leu Lys Tyr Arg Ala Arg Glu Pro Val Thr Lys Ala Glu  
1 5 10

<210> 27

30 <211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

35 Lys Lys Leu Leu Thr Gln His Phe Val Gln Glu Asn Tyr Leu Glu Tyr  
1 5 10 15

40

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/09790

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N5/08 A01N1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 46984 A (NICOLETTE CHARLES A ;SHANKARA SRINIVAS (US); GENZYME CORP (US)) 23 September 1999 (1999-09-23) cited in the application	1-21
Y	the whole document ----- -/--	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*Z\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 January 2002

Date of mailing of the international search report

22/01/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Döpfer, K-P

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/09790

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!  BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,  PHILADELPHIA, PA, US; 1997  MAKINO M ET AL: "A cryopreservation method  of human peripheral blood mononuclear  cells for efficient production of  dendritic cells."  Database accession no. PREV199799644877  XP002186870  abstract  &amp; SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY,  vol. 45, no. 6, 1997, pages 618-622,  ISSN: 0300-9475</p> <p>---</p>	1-21
Y	<p>LEWALLE P ET AL: "Freezing of dendritic  cells, generated from cryopreserved  leukaphereses, does not influence their  ability to induce antigen-specific immune  responses or functionally react to  maturation stimuli"  JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER  SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL,  vol. 240, no. 1-2, June 2000 (2000-06),  pages 69-78, XP004201567  ISSN: 0022-1759  cited in the application  the whole document</p> <p>---</p>	1-21
Y	<p>THURNER B ET AL: "Generation of large  numbers of fully mature and stable  dendritic cells from leukapheresis  products for clinical application"  JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER  SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL,  vol. 223, no. 1,  1 February 1999 (1999-02-01), pages 1-15,  XP004155750  ISSN: 0022-1759  the whole document</p> <p>---</p>	1-21
Y	<p>ROMANI N ET AL: "Generation of mature  dendritic cells from human blood An  improved method with special regard to  clinical applicability"  JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER  SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL,  vol. 196, no. 2,  27 September 1996 (1996-09-27), pages  137-151, XP004021269  ISSN: 0022-1759  the whole document</p> <p>-----</p>	1-21

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/09790

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9946984	A	23-09-1999	AU	3102599 A	11-10-1999
			WO	9946984 A1	23-09-1999
<hr/>					

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/09790

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 C12N5/08 A01N1/02

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data, PAJ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 46984 A (NICOLETTE CHARLES A ; SHANKARA SRINIVAS (US); GENZYME CORP (US)) 23. September 1999 (1999-09-23) in der Anmeldung erwähnt	1-21
Y	das ganze Dokument --- -/-	1-21



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. Januar 2002

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

22/01/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Döpfer, K-P

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online!  BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE,  PHILADELPHIA, PA, US; 1997  MAKINO M ET AL: "A cryopreservation method  of human peripheral blood mononuclear  cells for efficient production of  dendritic cells."  Database accession no. PREV199799644877  XP002186870  Zusammenfassung  &amp; SCANDINAVIAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY,  Bd. 45, Nr. 6, 1997, Seiten 618-622,  ISSN: 0300-9475</p> <p>---</p>	1-21
Y	<p>LEWALLE P ET AL: "Freezing of dendritic  cells, generated from cryopreserved  leukaphereses, does not influence their  ability to induce antigen-specific immune  responses or functionally react to  maturation stimuli"  JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER  SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL,  Bd. 240, Nr. 1-2, Juni 2000 (2000-06),  Seiten 69-78, XP004201567  ISSN: 0022-1759  in der Anmeldung erwähnt  das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-21
Y	<p>THURNER B ET AL: "Generation of large  numbers of fully mature and stable  dendritic cells from leukapheresis  products for clinical application"  JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER  SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL,  Bd. 223, Nr. 1,  1. Februar 1999 (1999-02-01), Seiten 1-15,  XP004155750  ISSN: 0022-1759  das ganze Dokument</p> <p>---</p>	1-21
Y	<p>ROMANI N ET AL: "Generation of mature  dendritic cells from human blood An  improved method with special regard to  clinical applicability"  JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER  SCIENCE PUBLISHERS B.V.,AMSTERDAM, NL,  Bd. 196, Nr. 2,  27. September 1996 (1996-09-27), Seiten  137-151, XP004021269  ISSN: 0022-1759  das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-21

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/09790<sup>1</sup>

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9946984      A	23-09-1999	AU      3102599 A WO      9946984 A1	11-10-1999 23-09-1999
<hr/>			